Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

BEGRÜNDET VON **W. RUHLAND** UND **H. WINKLER**

UNTER MITWIRKUNG VON
J. BONNER-PASADENA, **A. ERNST**-ZURICH, **H. v. GUTTENBERG**-ROSTOCK,
R. HARDER-GÖTTINGEN, **O. RENNER**-MÜNCHEN, **W. SCHUMACHER**-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

L. BRAUNER
MÜNCHEN

E. BÜNNING
TÜBINGEN

55. BAND, 1. HEFT
MIT 61 TEXTABBILDUNGEN
(ABGESCHLOSSEN AM 7. JUNI 1960)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1960

Planta (Berl.)

Preis DM 27.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Band 1—34 (1945) herausgegeben von *W. Ruhland* und *H. Winkler*. (Band 1—21, 1934, als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie", Abteilung E.) Band 35—47. Herausgegeben von *W. Ruhland* und *O. Renner*. Band 48—51. Herausgegeben von *W. Ruhland, L. Brauner* und *E. Bünning*

Die Zeitschrift „Planta", Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Die eingereichten Arbeiten sollen 2 Druckbogen (à 16 Druckseiten) in der Regel nicht überschreiten.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 40. — für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind. Der Autor verpflichtet sich, sie auch nachträglich nicht an anderer Stelle zu publizieren. Mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag geht das Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder einschließlich des Rechts der fotomechanischen Wiedergabe oder einer sonstigen Vervielfältigung an den Verlag über. Jedoch wird gewerblichen Unternehmen für den innerbetrieblichen Gebrauch nach Maßgabe des zwischen dem Börsenverein des Deutschen Buchhandels e.V. und dem Bundesverband der Deutschen Industrie abgeschlossenen Rahmenabkommens die Anfertigung einer fotomechanischen Vervielfältigung gestattet. Wenn für diese Zeitschrift kein Pauschalabkommen mit dem Verlag vereinbart worden ist, ist eine Wertmarke im Betrage von DM 0.30 pro Seite zu verwenden. *Der Verlag läßt diese Beträge den Autorenverbänden zufließen.*

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Leo Brauner, München 19, Menzingerstr. 67, Botanisches Institut der Universität, oder an

Professor Dr. Erwin Bünning, Tübingen, Botanisches Institut der Universität, Wilhelmstraße 5.

Springer-Verlag

Berlin-Wilmersdorf, Heidelberger Platz 3, Fernsprecher 830301
und
Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 28—30, Fernsprecher 27901

55. Band **Inhaltsverzeichnis** 1. Heft

Seite

ZIEGLER, H., Untersuchungen über die Feinstruktur des Phloems. I. Mitteilung. Die Siebplatten bei *Heracleum Mantegazzianum* SOMM. et LEV. Mit 5 Textabbildungen 1

BREMER, H. J., und H. G. SCHWEIGER, Der NH_3-Gehalt kernhaltiger und kernloser *Acetabularien*. Mit 4 Textabbildungen 13

WERZ, G., Anreicherung von Ribonucleinsäure in der Wuchszone von *Acetabularia mediterranea*. Mit 11 Textabbildungen 22

WERZ, G., Über Strukturierungen der Wuchszonen von *Acetabularia mediterranea*. Mit 13 Textabbildungen 38

MOHR, H., und I. PICHLER, Der Einfluß hellroter und dunkelroter Strahlung auf die geotropische Reaktion der Keimlinge von *Sinapis alba* L. Mit 4 Textabbildungen 57

KOLLMANN, R., Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von *Passiflora coerulea*. II. Mitteilung. Elektronenoptische Untersuchungen. Mit 21 Textabbildungen 67

LÜCK, H. B., Beobachtungen über die Resistenz von Zellen verschiedener Stellung, nebst Bemerkungen über Akineten. Mit 3 Textabbildungen . . . 108

BARGEN, G. v., Indol-3-Essigsäure im Apfel. Kurze Mitteilung 112

Die Wiedergabe von Gebrauchsnamen, Handelsnamen, Warenbezeichnungen usw. in dieser Zeitschrift berechtigt auch ohne besondere Kennzeichnung nicht zu der Annahme, daß solche Namen im Sinne der Warenzeichen- und Markenschutz-Gesetzgebung als frei zu betrachten wären und daher von jedermann benutzt werden dürften.

Planta 55, 1—12 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Darmstadt

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE FEINSTRUKTUR DES PHLOEMS

I. Mitteilung

DIE SIEBPLATTEN BEI *HERACLEUM MANTEGAZZIANUM* SOMM. et LEV.

Von

HUBERT ZIEGLER

Mit 5 Textabbildungen

(Eingegangen am 12. Februar 1960)

Einleitung

Der Feinstruktur der Siebröhren wird in letzter Zeit mit Recht besondere Aufmerksamkeit geschenkt. Einmal besteht begründete Hoffnung, daß eine genauere Kenntnis der Beschaffenheit der Leitbahnen wesentlich zum Verständnis des immer noch nicht endgültig geklärten Mechanismus des Assimilattransportes beitragen wird; das Vorliegen des einen oder des anderen zweier so wesensverschiedener Prozesse, wie sie die Bewegung der einzelnen Substanzen unabhängig voneinander im Plasma einerseits und die Verschiebung der Stoffe mit einem Massenstrom im Lumen der Siebröhren andererseits darstellen, müßte sich in entsprechender struktureller Anpassung der leitenden Zellen widerspiegeln.

Für die Beurteilung der Massenströmungstheorie (MÜNCH 1930), der einzigen präzise formulierten Theorie der Assimilatfernleitung, ist dabei die Beschaffenheit der Poren in den Siebplatten und die Frage des Vorhandenseins oder Fehlens eines Tonoplasten in den Siebröhren von besonderer Bedeutung. MÜNCH selbst nahm an, daß „die Plasmaverbindungen zwischen den Siebröhrengliedern offene Schläuche von beträchtlicher Weite darstellen, durch welche der Siebröhrensaft durch mechanische Druckdifferenzen mit großer Geschwindigkeit getrieben werden kann" (l. c., S. 134). Dieser Annahme standen schon verschiedene auf lichtmikroskopische Untersuchungen gestützte Angaben entgegen; vollends unvereinbar mit ihr sind aber die elektronenoptischen Bilder der Dünnstschnitte durch solche Siebporen (HEPTON, PRESTON und RIPLEY 1955, BEER 1959: *Cucurbita*; PRESTON 1958: *Vitis vinifera*; SCHUMACHER und KOLLMANN 1959: *Passiflora coerulea*), vorausgesetzt allerdings, die Präparation, vor allem das Anschneiden des Phloems, verändere die Feinstruktur nicht oder nicht wesentlich: Alle diese elektronenoptischen Darstellungen zeigen kompakte Plasmafüllungen der Siebporen, ohne die Andeutung von Porensystemen.

Beim Fehlen einer Lumenkommunikation zwischen den benachbarten Siebröhrengliedern, wie es die erwähnten Bilder klarzulegen scheinen, wird die Frage nach dem Vorhandensein eines Tonoplasten, also einer (relativ) semipermeablen Grenzschicht zwischen Plasma und Vacuole, besonders interessant. Ist ein normaler Tonoplast lückenlos im ganzen Zellbereich, auch über den Plasmabelägen der zu Siebplatten umgestalteten Querwände, ausgebildet, dann ist eine Verschiebung des Vacuoleninhaltes von Siebröhrenglied zu Siebröhrenglied, also eine „Massenströmung", mit der zu fordernden Geschwindigkeit kaum vorstellbar.

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen brachten keine eindeutige Klärung dieser Frage nach dem Tonoplasten der reifen Siebröhren (vgl. Übersicht bei ROUSCHAL 1940). Im Elektronenmikroskop glauben SCHUMACHER und KOLLMANN am Plasmaschlauch, der den Längswänden der Siebröhren anliegt, einen Tonoplasten gesehen zu haben; die Abbildung (Tafel VIII, Fig. 5) ist kaum als Beleg zu betrachten (doch mag dies an der drucktechnischen Wiedergabe liegen). Bemerkenswerterweise ist am Plasma über den Siebplatten (z. B. Tafel VIII, Fig. 3) kein Tonoplast festzustellen; es kann dies allerdings durch die — nach Meinung der Autoren — noch nicht optimale Fixierung bedingt sein.

Aus einem zweiten Grunde ist das Studium der Siebröhren-Feinstruktur von besonderem Interesse; handelt es sich bei den Siebröhren bzw. -zellen doch um Elemente, die im reifen Zustand kernlos sind. Es ist eine prinzipiell wichtige Frage, ob kernlose Zellen über längere Zeit ihre Mitochondrien intakt halten und ob sie ein endoplasmatisches Reticulum besitzen können. Während BEER bei *Cucurbita* das Fehlen von Mitochondrien (und eines Ergastoplasmas) in den reifen Siebröhren angibt, bilden SCHUMACHER und KOLLMANN in — allerdings noch relativ jungen — Siebröhren von *Passiflora* eindeutige Mitochondrien ab. Auch bei diesem Objekt finden sich aber (hauptsächlich in älteren Siebröhren?) die blasigen Gebilde (vgl. Tafel VIII, Fig. 3), die BEER bei *Cucurbita* feststellte und die man mit degenerierten Mitochondrien in Zusammenhang zu bringen geneigt ist.

SCHUMACHER und KOLLMANN haben schließlich noch Lamellensysteme im Siebröhrenplasma gefunden, die ihnen einen Vergleich mit Golgi-Körpern nahelegten, über deren Funktion aber noch nichts ausgesagt werden konnte.

Material und Methoden

Die elektronenoptischen Untersuchungen der Feinstruktur des Phloems wurden zuerst 1956 während eines Gastaufenthaltes am Institut für allgemeine Botanik der ETH Zürich mit dem Phloem von *Robinia pseudacacia* begonnen. Die Schwierigkeit einer Bestimmung des Entwicklungszustandes dieser Rindensiebröhren und die Notwendigkeit weitgehender Eingriffe bei der Präparation

(Verletzung des Phloems mit Entspannung der turgescenten Leitbahnen und Verschiebung des Zellinhaltes) ließen dieses Objekt als ungünstig erscheinen.

Als vorzüglich geeignet erwies sich dann das Phloem der ausgewachsenen Blattstiele von *Heracleum Mantegazzianum*. Zur Präparation wurde ein Leitbündel des innersten Kreises an der Grenze zum hohlen Stielinnern vorsichtig aus dem Grundgewebe herauspräpariert und der Holz- und Siebteil voneinander getrennt (vgl. ZIEGLER 1958), ohne daß das Phloem selbst verletzt worden wäre. Eine derart freigelegte Phloemstrecke wurde denn auch (in Kontrollversuchen, die nicht weiter verwendet wurden) ohne weiteres von Fluorescein-K (0,03%ig in 1%igem Agar 10 cm blattflächenwärts vom oberen Ende des freigelegten Phloemstranges an die hier auf etwa 1 cm freigelegte Phloemseite desselben Bündels gebracht) in vergleichbarer Geschwindigkeit wie im Grundparenchym belassene Siebteile durchwandert; sie waren also unverändert leitfähig.

Im Lichtmikroskop ließen sich an mit Carminessigsäure gefärbten Quetschpräparaten in den Siebröhren keine Kerne nachweisen; die Zellen waren offenbar voll ausgereift.

Die freie Phloemschlaufe wurde nun in flüssige Luft getaucht und in gefrorenem Zustand in einzelne Stücke gebrochen, die — ohne aufzutauen — sofort zur Gefriertrocknung kamen. Die trockenen Gewebsstücke wurden dann 3 Std in eiskalte 1%ige Osmiumsäure (mit Veronal-Acetat auf p_H 7,4 gepuffert) gebracht, wie üblich entwässert (über Aceton) und schließlich in einem Gemisch von 93 Teilen Methacrylsäurebutylester und 7 Teilen -methylester (+ 0,5% Percadox) bei 45° C eingebettet. Die Dünnstschnitte wurden mit einem Reichert-Ultramikrotom nach SITTE angefertigt und ohne Entfernung des Einbettungsmittels im Siemens-Übermikroskop 100 e_2 bei 80 kV Strahlspannung untersucht.

Ergebnisse

Die Dicke der Siebplatten ist bei unserem Objekt in der Regel etwas geringer als die der Siebröhrenseitenwände; während diese im Durchschnitt auf den Bildern etwa 1,5 μ dick erscheinen, messen jene etwa 0,8—1 μ (ohne den Kallosebelag). Von dieser Membranstärke entfallen in den Platten 0,2—0,5 μ auf die Primärwand, 0,2—0,4 μ auf jede der beiden Sekundärwände. Der Kallosebelag auf der Plattenfläche ist im Mittel etwa 0,2 μ dick, erreicht aber maximal 0,5 μ; die Kalloseauflage an der Wandung der Siebporen ist nicht immer ausgebildet (vgl. Abb. 2), sie kann aber auch bis 0,3 μ dick werden.

Die Länge der Siebplatten (im Längsschnitt durch die Siebröhren) ist von der Weite der Siebröhren und von dem Winkel abhängig, den die Platten mit den Siebröhrenmembranen bilden. Da die Weite der Siebröhren bei *Heracleum* 8—10 μ (meist 8—8,5 μ) beträgt und die Platten oft rechtwinklig angeordnet sind, ist der häufigste Wert für den Siebplattendurchmesser etwa 8,5 μ; doch werden im Extremfall auch Schrägstellungen der Platten bis zu 50° gefunden, wodurch die Größe der Siebplatten entsprechend zunimmt.

Die Siebporen haben sehr variable Weiten, von etwa 40—500 mμ.

Im Plasma der reifen *Heracleum*-Siebröhren konnten wir keine intakten Mitochondrien entdecken; es lag dies wohl nicht an der Wirkung

einer schlechten Fixierung, die zu einer Zerstörung dieser Strukturen geführt hätte — in den Geleitzellen derselben Präparate waren die Mitochondrien sicher zu identifizieren. Im Siebröhrenplasma fanden sich aber stets eine große Zahl von blasigen Gebilden der verschiedensten Durchmesser (zwischen etwa 30 und 200 mμ) und ovaler oder runder Form (Abb. 1). An geeigneten Bildstellen lassen die Membranen dieser

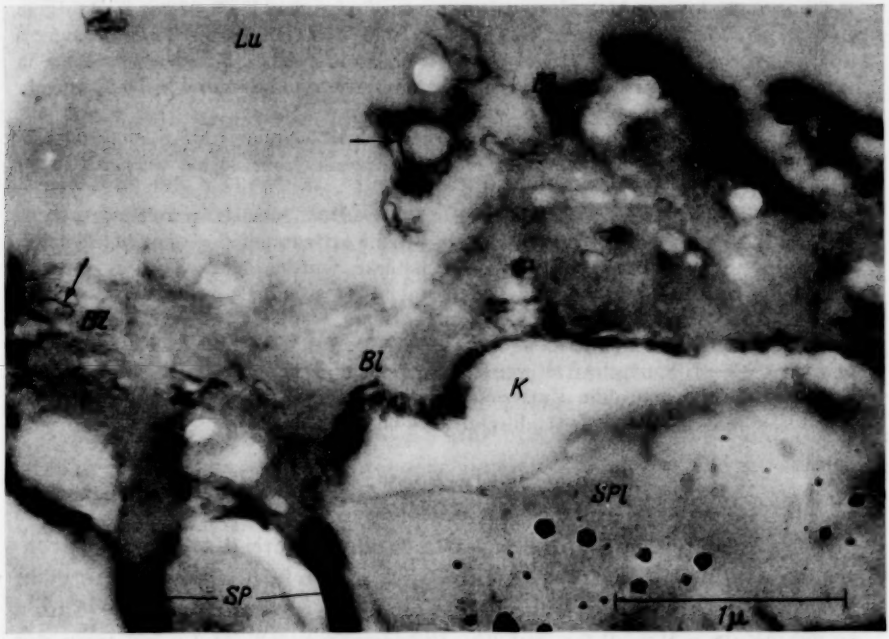


Abb. 1. Dünnstschnitt einer *Heracleum*-Siebplatte. Im Siebröhrenplasma zahlreiche Blasen (*Bl*) verschiedener Größe. Kein Tonoplast zum Lumen (*Lu*). *SPl* Siebplatte, *K* Kallose, *SP* Siebpore. Bei → Doppellamellenstruktur der Blasenmembranen sichtbar. Aufn.-Vergr. 12800 : 1, Endvergr. 30000 : 1

Blasen einen Aufbau aus zwei Lamellen erkennen. Ganz entsprechende Körper haben auch SCHUMACHER und KOLLMANN und BEER bei ihren Objekten gefunden. Ob diese Gebilde mit Mitochondrien in Verbindung zu bringen sind, etwa degenerierte Mitochondrien darstellen, ist nicht sicher; ihre Größe liegt jedenfalls beträchtlich unter der ausgewachsener Chondriosomen.

Das Grundplasma durchsetzt auch bei unserem Objekt und auch nach der beschriebenen schonenden Fixierung als Pfropf die Poren der Siebplatten (Abb. 2, 3). Wie die Stärke des Kallosebelages und die Weite der Poren ausweist, ist die abgebildete Siebplatte durchaus ausdifferenziert — die Leitbahnen dieses Stadiums sind ja auch voll leistungsfähig.

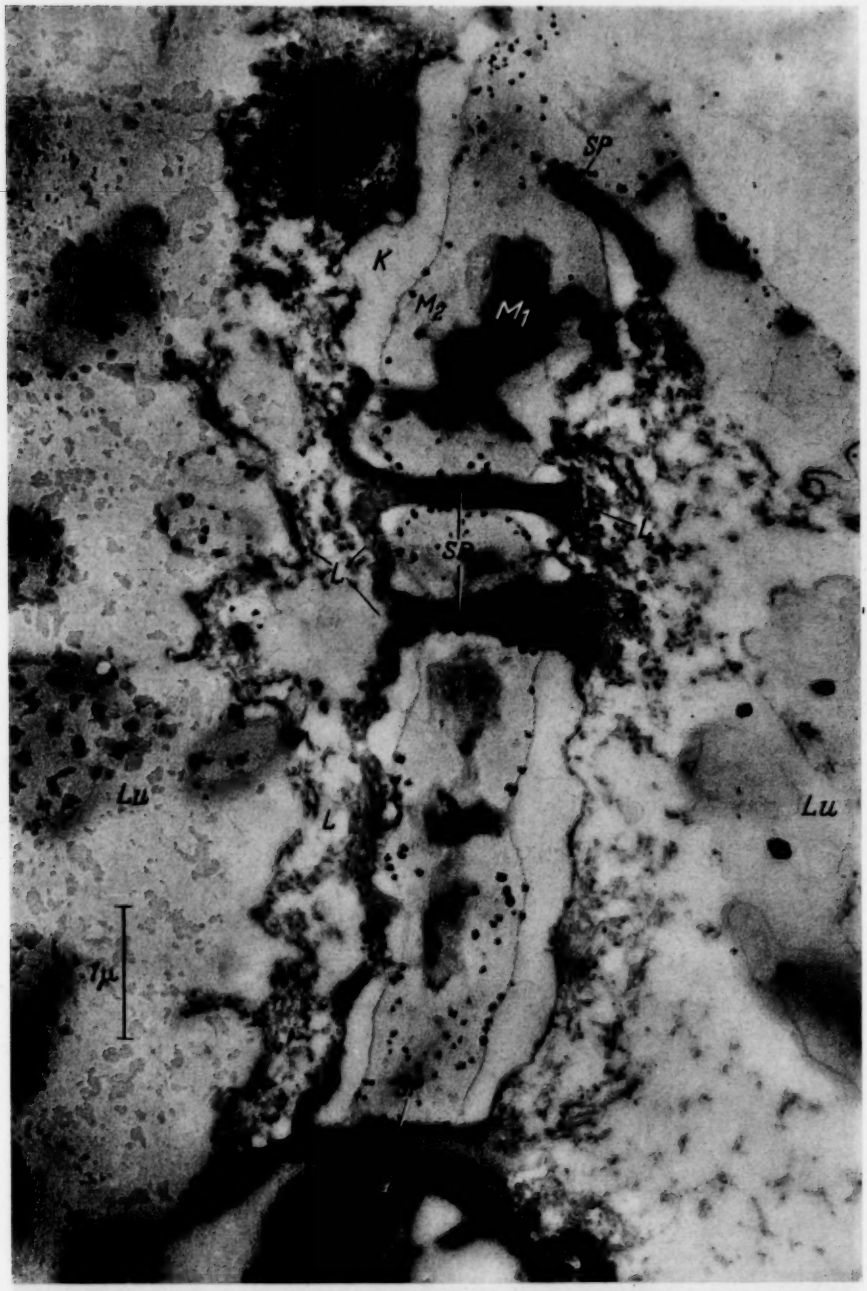


Abb. 2. Dünnstschnitt einer *Heracleum*-Siebplatte. Siebporen (*SP*) kompakt mit Plasma gefüllt. Siebröhrenplasma mit Lamellenstruktur (*L*). Kein Tonoplast. M_1 Primärwand, M_2 Sekundärwand, K Kalloseauflage der Siebplatte, *Lu* Lumen der Siebröhre. Aufn.-Vergr. 6200:1, Endvergr. 17000:1

Abb. 3. Detailaufnahme derselben Siebplatte wie in Abb. 2. Bezeichnungen wie in Abb. 2. Ferner: *DL* Doppellamellenstruktur, *R* Ringstrukturen.
Aufn.-Vergr. 12800:1, Endvergr. 54500:1

Wesentlich erscheint uns der Befund, wonach das Siebröhrenplasma bei *Heracleum* nicht nur vereinzelt unzusammenhängende Lamellensysteme aufweist, wie sie von SCHUMACHER und KOLLMANN bei *Passiflora*

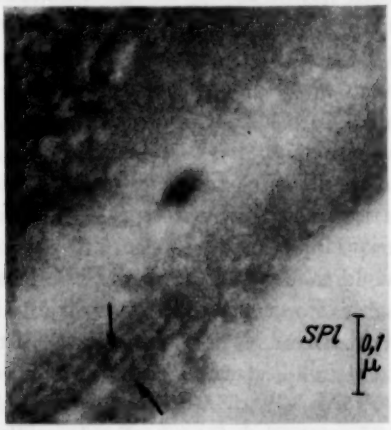


Abb. 4. Doppellamellensystem des Siebröhrenplasmas über einer Siebplatte (*SPl*). Bei → Doppellamellen besonders deutlich sichtbar. Aufn.-Vergr. 24100:1, Endvergr. 100000:1

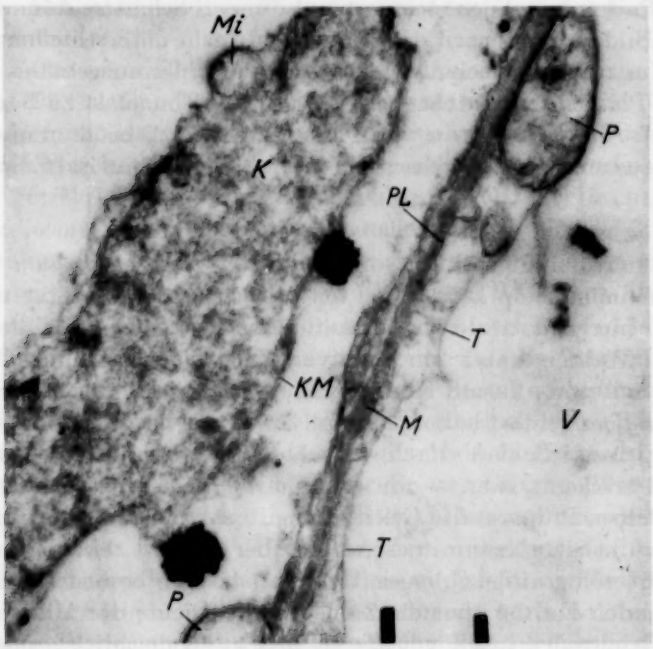


Abb. 5. Dünnstschnitt durch ein in vitro kultiviertes, bakterienfreies Sekundärtumorgewebe von *Helianthus annuus*. Beispiel eines deutlichen Tonoplasten (*T*). *M* Zellmembran, *PL* Plasmalemma (z. T. Doppellamellenstruktur erkennbar), *Mi* Mitochondrien, *K* Kern, *KM* Kernmembran, *P* Proplastid, *V* Vacuole. Aufnahme mit dem Philips-EM des Inst. f. allg. Bot. der ETH Zürich. Aufn.- und Wiedergabe-Vergr. 10000:1

gefunden wurden, sondern offenbar durchgehend charakteristisch strukturiert ist (Abb. 2—4). Die einzelnen Plasmastränge haben eine Dicke von etwa 60—80 Å. Sie lassen sich an günstigen Stellen in eine Doppellamelle auflösen (Abb. 3, 4), deren Einzellamellen etwa 20 Å dick sind und deren Abstand etwa 40 Å beträgt. Da sich vielfach ringförmige Strukturen desselben Durchmessers finden (Abb. 3, R), liegt es nahe anzunehmen, daß diese Doppellamellen längsgeschnittene Schläuche darstellen. Diese haben einen mittleren Abstand von etwa 100—120 Å voneinander.

Diese Strukturen sind also prinzipiell recht ähnlich beschaffen wie das sog. endoplasmatische Reticulum (vgl. die Übersichten bei PORTER 1954, FREY-WYSSLING 1955, SITTE 1958 u. a.), doch sind die beschriebenen Schläuche bzw. Lamellensysteme in den Siebröhren von *Heracleum* viel enger gepackt als im normalen Ergastoplasma (im Erbsenwurzelmeristem haben die parallelen Membranen einen mittleren Abstand von 150 Å und der Abstand der Zisternen voneinander beträgt etwa 400 Å; SITTE 1958).

Wichtig ist der Umstand, daß sich die Lamellensysteme offenbar auch in die Poren der Siebplatten hinein fortsetzen (Abb. 3). Infolge der dichten Packung und des nicht optimal dünnen Schnittes können sie in unseren Bildern im Innern der Poren nicht mehr unterschieden werden, doch ist es recht wahrscheinlich, daß sie auch hier ausgebildet sind.

Eine Plasmagrenzschicht, die eindeutig als Tonoplast zu bezeichnen wäre (vgl. Abb. 5), konnten wir in unseren reifen Siebröhren nie finden. Der Innensaum des Plasmas gegen den Zellsaftraum ist nicht scharf begrenzt.

Besprechung der Ergebnisse

In den reifen Siebröhren von *Heracleum Mantegazzianum* sind im Elektronenmikroskop keine intakten Mitochondrien zu erkennen; sie stimmen hier mit den von BEER untersuchten *Cucurbita*-Siebröhren überein. Während aber ein positiver Nachweis derartiger Elemente (wie ihn SCHUMACHER und KOLLMANN für — nur ? — jüngere Siebröhren von *Passiflora* geführt haben) absolut beweisend ist, kann ein negativer Befund prinzipiell auch durch schlechte Strukturerhaltung verursacht sein. Es erscheint zwar — wie erwähnt — nicht sehr wahrscheinlich, daß im selben Präparat die Geleitzellenmitochondrien bei der Fixierung erhalten, die Siebröhrenmitochondrien aber zerstört sein sollten; es ist aber nicht völlig ausgeschlossen, daß die letzteren besonders labil sind.

Auf jeden Fall ist aber die Zahl und die Dichte der Mitochondrien in den Geleitzellen (auch von *Heracleum*) unvergleichlich größer als in den Siebröhren, wie auch von SCHUMACHER und KOLLMANN und BEER gefunden wurde. Diese Tatsache stützt zweifellos unsere Vermutung, daß die hohe Atmungsintensität des Phloems (KURSSANOW und TURKINA

1952a, b, KURSSANOW 1952, WILLENBRINK 1957) im wesentlichen durch die Geleitzellen (und evtl. das Phloemparenchym) bestritten wird und deren stoffwechselphysiologische Aktivität widerspiegelt (ZIEGLER 1958). Eine unter spezifischem Energieaufwand in den Siebröhren verlaufende „aktivierte" Molekularbewegung der wandernden Substanzen ließe eine reichliche Versorgung dieser Zellen mit Mitochondrien erwarten, es sei denn, man nähme die Geleitzellen als Lieferanten von Energie in verwertbarer Form (z. B. ATP) an (vgl. ZIEGLER 1956). Man müßte dies in Anbetracht des Energiebedarfes der Struktur- und Semipermeabilitätserhaltung auf jeden Fall, wenn den reifen Siebröhren tatsächlich die Mitochondrien völlig mangelten.

Auch für das Fehlen des Tonoplasten im Siebröhrenplasma über den Siebplatten in unseren Präparaten gilt das geschilderte Bedenken; hier könnte ebenfalls eine Zerstörung durch die Fixierung erfolgt sein. Da aber bei unserer Präparation kaum eine Verschiebung des Siebröhreninhaltes stattgefunden hat (vgl. die gleichmäßige Verteilung des Plasmas zu beiden Seiten der Siebplatte in Abb. 2!), die zu einer mechanischen Beanspruchung des Tonoplasten geführt hätte, und da andererseits die Lamellenstruktur des Plasmas erhalten geblieben ist, scheint das tatsächliche Fehlen eines Tonoplasten (wenigstens über den Siebplatten) wahrscheinlicher.

Die Tatsache, daß reife Siebröhren plasmolysierbar sind (SCHUMACHER 1933, 1939, ROUSCHAL 1940, CURRIER, ESAU und CHEADLE 1955) bedeutet hiergegen keinen Widerspruch. Die Semipermeabilität wird auch durch eine einzige semipermeable Membran (das Plasmalemma) gewährleistet. Einen vergleichbaren Fall hat ULEHLA (1939) bei *Basidiobolus ranarum* gefunden, wo die basalen, älteren (kernlosen) Zellen keinen Tonoplasten mehr besitzen, aber doch noch einen plasmolysierbaren „Ektoplasten" aufweisen (vgl. auch ROUSCHAL 1940).

Der Befund, wonach das die Siebplatten überziehende Plasma eine ausgeprägte Lamellarstruktur besitzt, kann für die Beurteilung des Transportmechanismus bedeutsam werden. Sollten sich die submikroskopischen Porensysteme zwischen den einzelnen Strängen (Weite außerhalb der Poren etwa 100—120 Å) durch die Siebporen ziehen (wie es den Anschein hat), so wären damit die von CRAFTS (1948) für eine Massenströmung theoretisch geforderten Mikrocapillarensysteme gegeben. Die noch feineren Hohlraumsysteme, die von den beiden als Doppellamelle erscheinenden Lamellen eingefaßt werden (Abstand außerhalb der Siebporen etwa 40 Å), könnten sich dann evtl. in den Siebporen soweit verengen, daß die freie Beweglichkeit der längeren Moleküle (etwa der Saccharose) eingeschränkt wäre, wodurch es zu einer Molekularbeschleunigung durch „Spreitung" kommen könnte. Doch ist diese Vorstellung derzeit noch hypothetisch.

Es erscheint uns sehr wahrscheinlich, daß auch die von SCHUMACHER und KOLLMANN bei *Passiflora coerulea* abgebildeten und beschriebenen Lamellensysteme Teile dieser durchgehenden Plasmastruktur sind und daß die Isolierung in einzelne Pakete, die den Autoren den Vergleich mit Golgi-Körpern nahelegten, auf eine Wirkung der Präparation bzw. Fixierung zurückzuführen ist.

Vermutlich handelt es sich bei diesem Lamellensystem um ein endoplasmatisches Reticulum. Daß die Einzellamellen dichter gepackt sind als dies für gewöhnliche Zellen angegeben wird, könnte auf der besonderen Labilität und einer starken Schrumpfung des Siebröhrenplasmas beim Entwässern beruhen. Es ist in diesem Zusammenhang von großem Interesse, daß auch normale Plasmodesmen offenbar vielfach einen engen räumlichen Zusammenhang mit den Zisternen des Ergastoplasmas zeigen (SITTE 1958, PORTER 1959). Es wären dann auch in dieser Hinsicht die Siebplattenporen nur speziell dimensionierte Plasmodesmen.

Sollte sich die Ansicht bestätigen, daß die geschilderten Strukturen im Siebröhrenplasma ein endoplasmatisches Reticulum darstellen, so hätten wir den interessanten Fall des Fortbestehens dieser Struktur auch nach dem Verschwinden des Zellkernes, von dem dieses Mikrozisternensystem normalerweise seinen Ausgang nimmt und mit dem es in gewöhnlichen Zellen offenbar in engstem Stoffaustausch steht. Es ist denkbar, daß der Abbau des Kernes beim Reifen der Siebröhren in Zusammenhang steht mit der Freigabe dieses Mikrocapillarensystems für den Transport der Wanderstoffe, vor allem durch die Siebporenfüllungen.

Schließlich noch ein Wort zu der möglichen Bedeutung der Siebplatten im Transportsystem im Falle einer Massenströmung. SCHUMACHER und KOLLMANN nehmen an, daß hier ihre Existenz höchst lästig, ja unerklärbar sein müßte. Den Autoren erschiene offenbar ein durchgehendes Röhrensystem ohne Querwände (wie bei den Milchröhren) oder mit wenigen Querwänden (wie bei den Tracheen) wesentlich geeigneter. Aus zwei Gründen dürfte aber eine Kammerung des Assimilatfernleitsystems auch bei einer Massenströmung und auch im Falle der Passivität der Siebplattenstrukturen beim Transport vorteilhaft sein: Einmal vermindert und begrenzt oder verhindert diese „Schottenanordnung" das Auslaufen des Siebröhreninhaltes bei der — unter natürlichen Bedingungen nicht seltenen — groben mechanischen Verletzung des Phloems (unter diesen Umständen werden offenbar die Siebporen verstopft)[1], und zum andern gliedern die Siebplatten das

[1] Nur bei den Eschen mit besonders weiten Siebporen kann ein ausgiebiger, lang andauernder Saftfluß ähnlich dem Milchsaftfluß herbeigeführt werden, ein Umstand, der ja auch zur technischen Auswertung dieser Zuckersäfte geführt hat (vgl. HUBER 1953).

Leitsystem in einzelne Abschnitte, denen infolge der spezifischen Entwicklung bestimmte Ergänzungszellen (Eiweißzellen der Markstrahlen, Geleitzellen) in genau dimensioniertem Ausmaß zugeordnet werden, deren Leistung nicht nur für den Ein- und Austritt der Wanderstoffe in die Siebröhren und aus ihnen, sondern auch für die Aufrechterhaltung der Struktur der (kernlosen!) Leitbahnen selbst notwendig ist. Es besteht ja kaum mehr ein Zweifel, daß das System Siebröhre/Geleitzelle eine funktionelle Einheit darstellt, und wir möchten glauben, eine ausgewogenere und leistungsfähigere als ein hypothetisches System ungekammerte, meterlange Siebröhrenschläuche mit den angrenzenden Geleitzellsträngen ohne bestimmten Wirkungsbereich für die einzelne Geleitzelle.

Zusammenfassung

1. Das Phloem von *Heracleum Mantegazzianum* wird für die elektronenoptische Untersuchung in einer Weise präpariert, die eine Verlagerung des Siebröhreninhaltes ausschaltet.

2. In den reifen Siebröhren sind keine intakten Mitochondrien und über den Siebplatten kein Tonoplast nachweisbar.

3. Die Siebporen sind auch bei *Heracleum* und auch nach der schonenden Präparation nicht von einem zentralen Lumen durchzogen, sondern kompakt mit Plasma erfüllt.

4. Das Plasma über den Siebplatten weist eine spezifische Lamellenstruktur auf, die sich wahrscheinlich auch in die Siebporen fortsetzt und die vermutlich einem endoplastischen Reticulum entspricht.

Herrn Professor Dr. U. Hofmann, Eduard Zintl-Institut für anorganische Chemie der TH Darmstadt, bin ich für die freundliche Erlaubnis zur Benützung des Elektronenmikroskopes zu Dank verpflichtet; Frl. K. Heideklang, Frau D. Berner und Frl. G. Dreisbusch danke ich für ihre Mitarbeit, der Deutschen Forschungsgemeinschaft für die Unterstützung der Arbeit.

Literatur

Beer, M.: Fine structure of phloem of Cucurbit as revealed by the electron microscope. Vortr. IX. Internat. Bot. Kongr., Montreal, 1959. Abstr. in: Proc. IX. Internat. Bot. Congr. **2**, 26 (1959). — Crafts, A. S.: Movement of materials in phloem as influenced by the porous nature of the tissues. In: Interaction of water and porous materials. Faraday Soc. Disc. **3**, 153—159 (1948). — Currier, H. B., K. Esau and V. I. Cheadle: Plasmolytic studies of phloem. Amer. J. Bot. **42**, 68—81 (1955). — Frey-Wyssling, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. In: Protoplamatologia, Bd. 2, A 2. Wien: Springer 1955. — Hepton, C. E. L., R. D. Preston and G. W. Ripley: Electron microscopic observations on the structure of the sieve plates in *Cucurbita*. Nature (Lond.) **176**, 868—870 (1955). — Huber, B.: Die Gewinnung des Eschenmanna — eine Nutzung von Siebröhrensaft. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 340—346 (1953). — Kurssanow, A.L.: Die Bewegung organischer Substanzen in der Pflanze. Bot. Z. **37**, 585—593 (1952). Kurssanow, A. L., u. M. W. Turkina: Die Atmung der Leitbündel. Dokl.

Akad. Nauk SSSR. **84**, 1073 (1952a) [Russisch]. — Die Atmung der Leitgewebe und der Transport der Saccharose. Dokl. Akad. Nauk SSSR. **85**, 649—652 (1952b) [Russisch]. — MÜNCH, E.: Die Stoffbewegungen in der Pflanze. Jena: Gustav Fischer 1930. — PORTER, K. R.: Electron microscopy of basophilic components of cytoplasma. J. Histochem. Cytochem. **2**, 346—375 (1954). — Structure of cytoplasma. Vortr. IX. Internat. Bot. Kongr., Montreal, 1959. Abstract in: Proc. IX. Internat. Bot. Congr. **2a**, 28 (1959). — PRESTON, R. D.: The ascent of sap and the movement of soluble carbohydrates in stems of higher plants. Proc. X. Symp. of the Colston Res. Soc., p. 366—382, 1958. — ROUSCHAL, E.: Untersuchungen über die Protoplasmatik und Funktion der Siebröhren. Flora (Jena) **35**, 135—200 (1940). — SCHUMACHER, W.: Untersuchungen über die Wanderung des Fluoreszeins in den Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **77**, 685—732 (1933). — Über die Plasmolysierbarkeit der Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **88**, 545—553 (1939). — SCHUMACHER, W., u. R. KOLLMANN: Zur Anatomie des Siebröhrenplasmas bei *Passiflora coerulea*. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 176—179 (1959). — SITTE, P.: Die Ultrastruktur von Wurzelmeristemzellen der Erbse (*Pisum sativum*). Protoplasma **49**, 447—522 (1958). — ULEHLA, V.: Über einen natürlich isolierten und überlebenden Ektoplasten in den „leeren" Zellen von *Basidiobolus ranarum* und seine Semipermeabilität. Arch. exp. Zellforsch. **22**, 501—514 (1939). — WILLENBRINK, J.: Über die Hemmung des Stofftransports in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme. Planta (Berl.) **48**, 269—342 (1957). — ZIEGLER, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956). — Über die Atmung und den Stofftransport in den isolierten Leitbündeln der Blattstiele von *Heracleum Mantegazzianum* SOMM. et LEV. Planta (Berl.) **51**, 186—200 (1958).

Prof. Dr. HUBERT ZIEGLER,
Botanisches Institut der Technischen Hochschule, Darmstadt, Roßdörferstr. 140

Planta 55, 13—21 (1960)

Aus dem Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling, Wilhelmshaven

DER NH_3-GEHALT KERNHALTIGER UND KERNLOSER *ACETABULARIEN*

Von

H. J. Bremer und H. G. Schweiger*

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Februar 1960)

Einleitung

Die einkernige Grünalge *Acetabularia mediterranea* wird seit längerer Zeit zur Prüfung der Kernabhängigkeit oder relativen Kernunabhängigkeit cytoplasmatischer Prozesse verwendet, da ihr im Rhizoid gelegener Zellkern leicht zu entfernen ist (Hämmerling 1934). Die kernlose Zelle zeigt die Fähigkeit weiterzuwachsen, Wirtel und Hüte zu bilden (Hämmerling 1934, Hämmerling 1957), Eiweiß (Vanderhaeghe 1954, Brachet et al. 1955, Clauss 1958), darunter Plastidenpigmente (Richter 1958), Kohlenhydrate (Clauss und Keck 1959) sowie säurelabile Phosphate und Phospholipoide (Schweiger und Bremer 1960) zu synthetisieren (Hämmerling et al. 1958). Mit Ausnahme der Kohlenhydrate ist aber diese Zunahme mit der Zeit geringer als in kernhaltigen Vergleichspflanzen. Dagegen nimmt die Aktivität der „morphogenetischen Substanzen" nicht mehr zu (Hämmerling 1934, J. u. Ch. Hämmerling 1959). Außerdem ist die kernlose Pflanze nicht mehr in der Lage, ihren RNS-Bestand zu vermehren (Richter 1959, Naora, Richter u. Naora 1959).

Im Verlauf von Untersuchungen über die Besonderheiten des Stoffwechsels kernloser Zellen wurden in kernhaltigen und kernlosen Pflanzen der Ammoniak- und der Eiweißgehalt bestimmt. Es wurde dabei auch die Möglichkeit geprüft, den NH_3-Gehalt von Trichloressigsäure-Filtraten direkt mit der Hypochlorit-Phenolat-Methode (Lubochinsky u. Zalta 1954, Schweiger et al. 1957) zu bestimmen und durch diese einfachere Methode die kompliziertere Mikrodiffusionsmethode nach Conway (1950) zu ersetzen.

Untersuchungen über den Gehalt an Ammoniak scheinen wegen seiner zentralen Stellung im Stickstoffhaushalt autotropher Pflanzen besonders erwünscht. Bisher fehlen entsprechende Arbeiten an *Acetabularia*. Versuche von Giardina (1954) beziehen sich nur auf den säurelöslichen Stickstoff. Er fand, daß der säurelösliche Stickstoff in

* Mit Unterstützung der Deutschen Forschungsgemeinschaft.

kernlosen Zellen von *A. mediterranea* stärker zunimmt als in kernhaltigen. Nach Brachet et al. (1955) besteht dieser vorwiegend aus α-Aminostickstoff, eine Annahme, die sich, wie wir sehen werden, nicht aufrecht erhalten läßt.

Methodik

Material. Die verwendeten Zuchten von *Acetabularia mediterranea* wurden im hiesigen Institut gemäß den Vorschriften von Hämmerling (1944) und Beth (1953) in Erdschreiberlösung herangezogen.

Zu Versuchen wurden jeweils noch hutlose Pflanzen gleicher Aufzucht verwendet. Die angegebenen Werte beziehen sich auf 4 Parallelbestimmungen von je 50 Pflanzen. Die Mittelwerte der Längen pro weiterwachsende Pflanze und die Anzahl der entstandenen Hüte pro 50 Pflanzen finden sich in den Abbildungen.

Kernlose Pflanzen wurden durch Amputation des Rhizoids mit der Weckerschere hergestellt. Ihre Zucht bis zur Verarbeitung erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die der kernhaltigen *Acetabularien* an der künstlichen Sonne. Zu Beginn eines Versuches wurden von 15—20 mm langen Pflanzen einer Kulturreihe bei der Hälfte die Rhizoide entfernt. Am 0., 10. und 20. Tag entnahmen wir 4×50 kernhaltige und die gleiche Anzahl kernloser Pflanzen. Um gleiche Versuchsbedingungen zu schaffen, wurden auch bei den bisher kernhaltig gewachsenen Pflanzen 2 Tage vor der Aufarbeitung das Rhizoid entfernt und sie anschließend diffusem Tageslicht ausgesetzt. In 2 Versuchsreihen wurden die ganzen, kernhaltigen Pflanzen ohne vorherige Entfernung des Kernes homogenisiert.

Nach Messung der Wuchsleistung, Entfernung anhaftender Verunreinigungen durch Pinseln und kurzem Waschen in destilliertem Wasser wurden je 50 Pflanzen in 10 ml 5%iger, eisgekühlter Trichloressigsäure mit vorgekühlten Glashomogenisatoren vom Typ Elvehjem-Potter homogenisiert. Danach erfolgte die Trennung der säurelöslichen von den -unlöslichen Bestandteilen in der Kühlzentrifuge zwischen 0 und 5° C bei 40,000 g in 20 min. Nach dem Dekantieren wurde der klare Überstand bei —20° C bis zur Bestimmung eingefroren. Das Sediment wurde einmal mit 5%iger Trichloressigsäure und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und für die Gesamteiweißbestimmung nach der Methode von Lowry et al. (1950) verwendet.

Für die Ammoniakbestimmung wurden folgende Reagentien benutzt (Lubochinsky und Zalta 1954, Schweiger et al. 1957):

1. Phenolreagens. 50 g Phenol p. a. und 25 g Natriumhydroxyd p. a. werden mit destilliertem Wasser auf 500 ml aufgefüllt. Das Reagens hält sich bei —20° mindestens zwei Monate, bei Zimmertemperatur dagegen nicht länger als eine Woche.

2. Phosphatpuffer, pH 12,4. 38,017 g (0,1 M) $Na_3PO_4 \cdot 12\ H_2O$, p. a., und 35,817 g (0,1 M) $Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$, p. a., werden in destilliertem Wasser gelöst und auf 1000 ml aufgefüllt.

3. Nitroprussidnatrium, p. a., 100 mg werden in 10 ml destilliertem Wasser gelöst. Von dieser Lösung werden 4 ml auf 100 ml mit Aqua dest. aufgefüllt. Diese Lösung muß unmittelbar vor jeder Bestimmung neu angesetzt werden.

4. Die käufliche Natriumhypochloritlösung (0,65 M) wird 1:5 verdünnt. Sie muß chlorfrei sein. Sie wird vor jeder Bestimmung neu verdünnt.

Ausführung. Für die Bestimmung wurde ein Endvolumen von 20 ml gewählt. Zu einer Probe, die 0,5 bis 10 $\mu g NH_3$ in einem Probenvolumen bis zu 12 ml enthalten kann, werden 2 ml Phenolreagens (2,23 mM), 2 ml Phosphatpuffer, 2 ml Nitroprussidnatriumlösung (2,68 μM) und 2 ml der verdünnten Hypochloritlösung

(0,226 mM) gegeben. Das Endvolumen wird durch Auffüllen mit destilliertem Wasser hergestellt. Nach dem Umschütteln läßt man die Farbe bei Zimmertemperatur im Dunkeln im Laufe 1 Std sich entwickeln. Sie ist mindestens 24 Std stabil. Wichtig für die Bestimmung ist, daß die Reagentien eiskalt sind, da sonst eine Reproduzierbarkeit der Ergebnisse schwer zu erreichen ist. Bezüglich der Proportionalität zwischen Farbentwicklung und NH_3-Konzentration sei auf die Arbeit von LUBOCHINSKY und ZALTA (1954) verwiesen. Das Spektrum des Farbkomplexes hat sein Maximum bei 646 mμ. Glutamin, Glutaminsäure und Harnstoff haben keinen Einfluß auf die Farbbildung (SCHWEIGER et al. 1957).

Die NH_3-Bestimmung erfolgte direkt im Trichloressigsäure-Extrakt. Es wurden jeweils 0,25 ml verwendet. Zur Sicherung der Ergebnisse wurden in einigen Fällen Parallelbestimmungen nach der Mikrodiffusionsmethode von CONWAY (1950) durchgeführt. Die NH_3-Konzentration im Einsatz der Schälchen (0,01 N HCl) wurde dabei nach der Hypochlorit-Phenolat-Methode bestimmt.

Ergebnisse

Um die Möglichkeit auszuschließen, daß bei der hier angewendeten, relativ einfachen „direkten" NH_3-Bestimmung in den Trichloressigsäure-Extrakten von *Acetabularia* nicht der gesamte Ammoniak erfaßt oder durch andere Substanzen ein höherer Wert vorgetäuscht wird, wurde ein Vergleich zwischen der direkten Ammoniakbestimmung und der spezifischen, aber umständlicheren Mikrodiffusionsmethode nach CONWAY durchgeführt. Wie aus der Tabelle zu entnehmen ist, stimmen die mit beiden Methoden gewonnenen Werte gut überein.

Tabelle. *Vergleich der Conway-Methode mit der direkten NH_3-Bestimmung durch die Hypochlorit-Phenolat-Methode in Trichloressigsäureextrakten aus Acetabularia mediterranea*

Die Prozentangaben sind auf die Conway-Methode bezogen.

TCA-Extrakt	NH_3-Gehalt in μMol		Gefunden in Prozent
	nach CONWAY	durch direkte Bestimmung	
0,25 ml I	0,326	0,325	99,5
0,25 ml II	0,230	0,237	103,0
0,25 ml III	0,324	0,314	97,0
0,25 ml IV	0,235	0,244	103,7

Von insgesamt sechs Versuchsreihen seien drei aufgeführt, die anderen entsprechen diesen. Es wurde die Längenzunahme, die Hutbildung, die Ammoniak- und die Eiweißkonzentration bei kernhaltigen und kernlosen Pflanzen im Verlauf ihres Wachstums am 0., 10. und 20. Tag gegenübergestellt. In den Versuchen 1 bis 3 wurden die kernhaltigen Pflanzen 2 Tage vor ihrer Aufarbeitung kernlos gemacht.

In Abb. 1a zeigt das Wachstum der kernhaltigen und der kernlosen Pflanzen den üblichen Verlauf. Die Längenzunahme der kernlosen Acetabularien ist, wie üblich, zwischen dem 10. und dem 20. Tag bereits zum Stillstand gekommen, auch bei denen, die keine Hüte bildeten. Eine Eiweißsynthese ist auch bei den kernlosen Pflanzen festzustellen (Abb. 1c), wie es bereits durch die Versuche von VANDERHAEGHE (1954), BRACHET et al. (1955) sowie HÄMMERLING et al. (1958) bekannt war.

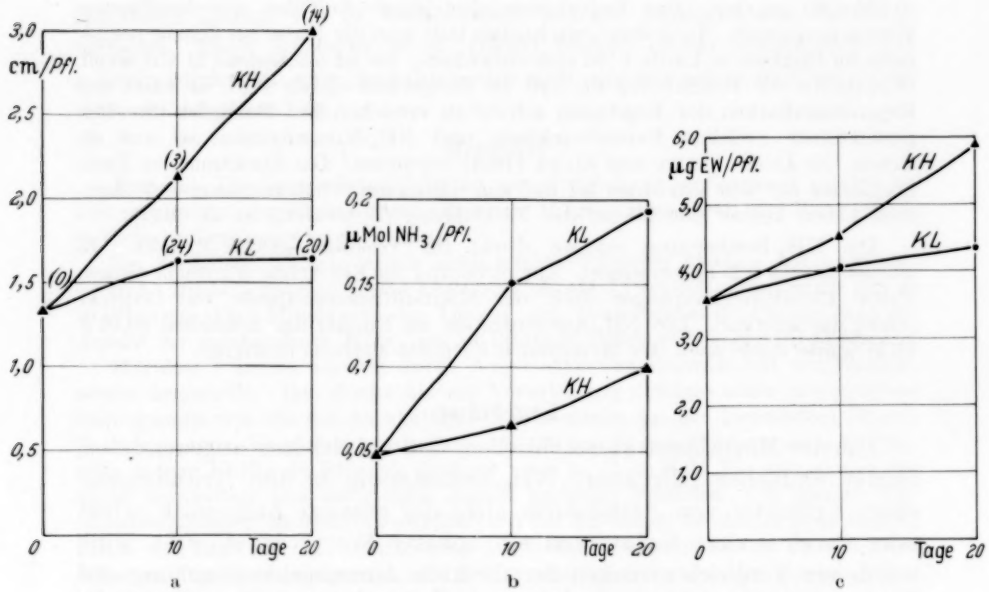


Abb. 1 a—c. Es wird die Wuchsleistung, das NH_3- und das Eiweißverhalten kernhaltiger und kernloser Pflanzen aus Versuch 2 gezeigt. Bei kernhaltigen Pflanzen wurde 2 Tage vor ihrer Aufarbeitung der Kern entfernt. Die einzelnen Werte entsprechen dem Mittelwert von 4 Vergleichskulturen von je 50 Pflanzen. a Längenzunahme in cm/Pflanze. Die eingeklammerten Zahlen geben die Anzahl der Hüte pro 50 Pflanzen an. b Ammoniakgehalt kernhaltiger und kernloser Pflanzen. c Das Eiweißverhalten der kernlosen und kernhaltigen Pflanzen

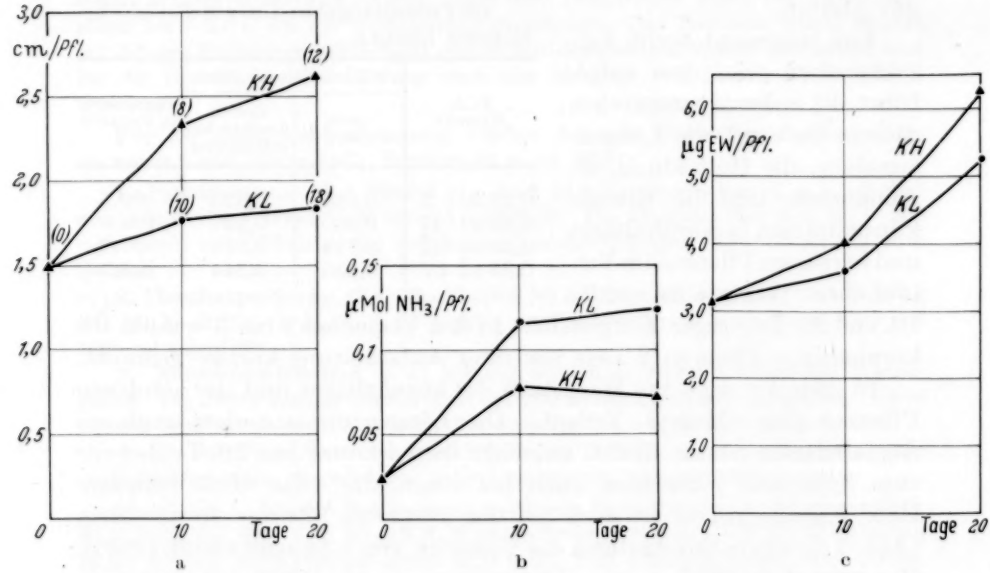


Abb. 2 a—c. Wuchsleistung (Stiel- und Hutbildung), NH_3- und Eiweißverhalten in Versuch 3

Sie dauert länger als das Wachstum (Werz u. Hämmerling 1959). Die Eiweißzunahme ist in den kernhaltigen größer als in den kernlosen Algen. Die Eiweißwerte liegen aber nach der generell durchgeführten Bestimmung nach Lowry et al. (1950) in der Gesamtheit niedriger als bei ausschließlicher Reststickstoffbestimmung nach Veraschung des säureunlöslichen Sediments.

Wie Abb. 1b zeigt, ist die Konzentration des freien Ammoniaks in *Acetabularien* unerwartet hoch. In kernlos gewachsenen Zellen ist seine Konzentration signifikant höher als in kernhaltigen. Es scheint nach dem Kurvenverlauf ein reziprokes Verhalten zwischen Protein- und Ammoniakzunahme während des Wachstumsprozesses zu bestehen. Ein analoges Bild zeigen die Ergebnisse von Versuch 3 (Abb. 2a—c).

Um dem Einwand zu begegnen, daß das Ammoniak bei den kernhaltigen Zellen durch die frische Schnittfläche bei der Entfernung des Kernes abdiffundiert sei und so die in bezug auf die kernlosen Pflanzen niedrigeren NH_3-Werte zustande kommen, wurden in 2 Versuchen die kernhaltigen Pflanzen in toto aufgearbeitet. Die Ergebnisse eines dieser Versuche zeigt Abb. 3. Auch hier findet sich in kernlosen Pflanzen eine Ammoniakvermehrung, die jene der kernhaltigen Zellen übertrifft.

Zur Kontrolle, ob das Ammoniak der wesentliche Stickstoffbestandteil im Trichloressigsäure-Extrakt ist, wurde in einigen Versuchsreihen die α-Aminostickstoffbestimmung nach Yemm und Cocking (1955) durchgeführt. Diese Methode entspricht der von Brachet et al. angewendeten Methode nach Moore und Stein (1948), nur daß hier das Ninhydrin in Methylglykol gelöst und mit Kaliumcyanid in reduzierter Form gehalten wird. In Abb. 4 ist einer dieser Versuche dargestellt. Der Kurvenverlauf entspricht ungefähr demjenigen, wie er von Brachet et al. (1955) angegeben ist. Jedoch ist zu bedenken, daß in diesem Fall nicht der wahre α-Aminostickstoff bestimmt wurde. Da das freie Ammoniak ebenfalls, allerdings mit etwas schwankender Farbentwicklung mit dem Ninhydrinreagens reagiert, muß der α-Aminostickstoffwert mit Hilfe eines Standards für den Ammoniakgehalt korrigiert werden. Dies ist bei geringer NH_3-Konzentration, bezogen auf die Aminosäurekonzentration, mit hinreichender Genauigkeit möglich. Wenn jedoch das Ammoniak die Aminosäuren in ihrer Konzentration wesentlich übertrifft, wie es bei den *Acetabularien* der Fall ist, wird durch die relativ schwankenden Extinktionen, die bei der Reaktion von Ammoniak mit dem Ninhydrinreagens auftreten, eine genaue Bestimmung der α-Aminostickstoffkonzentration unmöglich. Nach einigen orientierenden Versuchen liegt der α-Aminostickstoffgehalt der Pflanze bei nur 0,01 μM. Für diese Bestimmungen wurde das Ammoniak vor der α-Aminostickstoffbestimmung durch Einengen in leicht alkalischem Milieu vertrieben. In den Angaben von Brachet et al. (1955) findet sich kein Hinweis

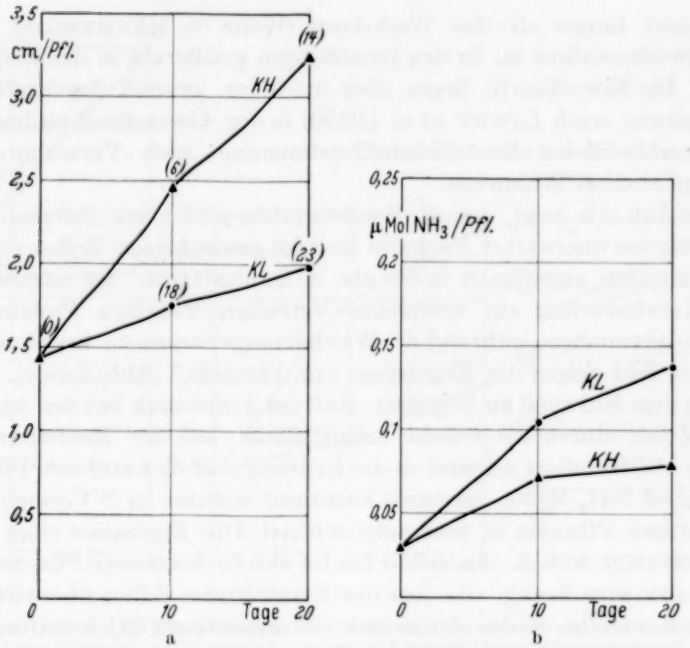


Abb. 3a u. b. Es wird die Wuchsleistung und das Ammoniakverhalten kernloser und kernhaltiger *Acetabularia* gezeigt, bei denen die kernhaltigen Zellen in toto aufgearbeitet wurden ohne vorherige Entfernung des Kernes. Versuch 4. (Die Stielbildung war in diesem Falle zwischen dem 10. und 20. Tage noch nicht beendet)

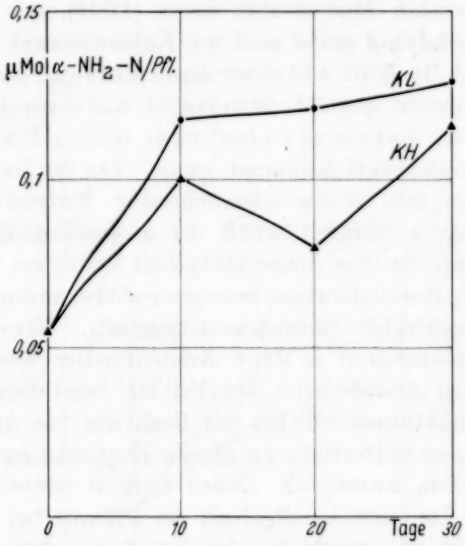


Abb. 4. Die „scheinbare" α-Aminostickstoffkonzentration kernhaltiger und kernloser Pflanzen. Das NH_3 wurde nicht vor der Bestimmung vertrieben. α-Aminostickstoffbestimmung nach der Methode von Yemm und Cocking (1955). Versuch 1
▲—▲—▲ kernhaltige *Acetabularia* ●—●—● kernlose *Acetabularia*

darauf, daß der NH_3-Gehalt bestimmt und zur Korrektur berücksichtigt wurde. Die fehlende Korrektur würde die hohen α-Aminostickstoffwerte erklären.

Diskussion

1. Das Ammoniak nimmt eine zentrale Stellung im Stickstoffhaushalt autotropher Pflanzen ein, da offenbar der gesamte für den Einbau in organische Verbindungen benötigte Stickstoff die Stufe des NH_3 passieren muß. Das NH_3 wird im allgemeinen durch enzymatische Reduktion von aufgenommenem Nitrat gebildet, doch können auch Ammoniumsalze von der Pflanze direkt verwendet werden. Die Glutaminsäuredehydrogenase scheint in Pflanzen die einzige Aminosäuredehydrogenase zu sein, welche den Ammoniakeinbau katalysiert (Fincham 1951). Nach Virtanen und Tarnanen (1932) besitzen außerdem einige Pflanzen Aspartaseaktivität. Sicher nicht ohne Bedeutung ist unter gewissen Bedingungen der Ammoniakeinbau mit Hilfe der Glutamin- und der Asparaginsynthetase. Diese enzymatischen Reaktionen kommen bei ihrer Umkehr auch als NH_3-Quelle in Frage. Daneben ist aber in Analogie zu tierischen Zellen wie z. B. jugendlichen Erythrocyten und Nervenzellen auch noch eine Ammoniakfreisetzung aus Adeninderivaten denkbar, wenn auch die entsprechenden Desaminasen mit Ausnahme der Adenosindesaminase bei *Acetabularien* noch nicht untersucht worden sind. Eine Adenosindesaminase ließ sich in *Acetabularia* nicht nachweisen (Schweiger unveröff.).

2. Der erhöhte Ammoniakgehalt kernloser *Acetabularien* weist darauf hin, daß durch die Entkernung ein Prozeß ausfällt, der direkt oder indirekt den Ammoniakhaushalt beeinflußt und so die Akkumulation bedingt. Auf welcher Stufe diese Unterbrechung zu suchen ist, läßt sich aus den vorliegenden Versuchen nicht mit Sicherheit entnehmen. Es dürfte sich dabei um eine Störung von Ammoniakeinbau oder -verwertung handeln. Dagegen ist eine durch den Verlust des Kernes hervorgerufene Steigerung des Abbaus N-haltiger Substanz deshalb unwahrscheinlich, weil auch in den kernlosen Zellen eine Proteinvermehrung stattfindet, die an das Vorhandensein von N-haltigen Vorstufen gebunden ist. Theoretisch könnte noch eine erhöhte Synthese- oder Akkumulationsrate in Betracht gezogen werden. Hinzuweisen ist auf die Analogie des Verhaltens von NH_3 und Kohlenhydraten (Clauss u. Keck 1959) in kernlosen Zellen. Beide Produkte nehmen in kernlosen Zellen stärker als in kernhaltigen zu.

3. Giardina (1954) bestimmte in säurelöslichen Extrakten den Gesamtstickstoff nach Veraschung. Er konnte deshalb keine Angaben über die Natur der vorhandenen Stickstoffverbindungen machen. Die Annahme von Brachet et al. (1955), daß der trichloressigsäurelösliche

Extrakt von *Acetabularia mediterranea* vorwiegend Aminosäuren als stickstoffhaltige Verbindungen enthält, dürfte aus den bereits angeführten Gründen nicht zutreffend sein.

4. Der Ammoniakgehalt unserer Kulturflüssigkeit, des „Erdschreibers", betrug etwa 0,05 μM NH_3/ml. Das würde bei dem geringen Volumen einer Pflanze bedeuten, daß zwischen der Ammoniakkonzentration der Zelle und der des Kulturmediums ein beträchtlicher Konzentrationsgradient besteht. *Acetabularia* muß also die Fähigkeit haben, Ammoniak zu akkumulieren.

5. Infolge der Übereinstimmung der Ergebnisse zwischen der direkten Ammoniakbestimmung und der Mikrodiffusionsmethode nach Conway ist es unwahrscheinlich, daß andere Substanzen bei unseren Versuchen an der Farbentwicklung beteiligt sind und als Ammoniak erscheinen. Bei der Anwendung der direkten Ammoniakbestimmung für Trichloressigsäure-Extrakte aus anderen Pflanzen ist es ratsam, vorher durch Vergleich mit der Mikrodiffusion die Anwendbarkeit an dem betreffenden Objekt zu prüfen. Es ist mit dieser Methode möglich, große Serienbestimmungen bei einem mittleren Fehler von unter 2% in relativ kurzer Zeit durchzuführen. Außerdem läßt sich die Empfindlichkeit der Methode durch Verkleinerung des Endvolumens noch weit unter 1 μg NH_3 pro Probe ausdehnen. Auch eine Kombination mit der Mikrodiffusionstechnik ist möglich.

Zusammenfassung

Es wurde der Ammoniakgehalt kernloser und kernhaltiger *Acetabularia mediterranea* im Verlauf ihres Wachstums bestimmt. Er ist unerwartet hoch, bezogen auf andere N-Verbindungen. In kernlosen Pflanzen nimmt der Ammoniakgehalt signifikant stärker zu als in kernhaltigen. Die Bestimmung erfolgte im Trichloressigsäure-Extrakt durch direkte Bestimmung mit der Hypochlorit-Phenolat-Methode. Die Verwendbarkeit dieser Methode wurde durch Vergleich mit der Mikrodiffusionsmethode nach Conway geprüft.

Literatur

Beth, K.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkung des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen Acetabularia-Zellen. Z. Naturforsch. **8b**, 334—342 (1953). — Brachet, J., H. Chantrenne et F. Vanderhaeghe: Recherches sur les Interactions Biochimiques entre le Noyau et le Cytoplasme chez les Organismes Unicellulaires. II. Acetabularia mediterranea. Biochim. biophys. Acta **18**, 544—563 (1955). — Clauss, H.: Über quantitative Veränderungen der Chloroplasten- und cytoplasmatischen Proteine in kernlosen Teilen von Acetabularia mediterranea. Planta (Berl.) **52**, 334—350 (1958). — Clauss, H., u. K. Keck: Über die löslichen Kohlenhydrate der Grünalge Acetabularia mediterranea und deren quantitative Veränderungen in kernhaltigen und kernlosen Teilen. Planta

(Berl.) **52**, 543—553 (1959). — Conway, E. J.: Microdiffusion analysis and volumetric error. London 1950. — Fincham, J. R. S.: The occurence of glutamic dehydrogenase in Neurospora and its apparent absence in certain mutant strains. J. gen. Microbiol. **5**, 793—806 (1951). — Giardina, G.: Rôle of the nucleus in the maintenance of the protein level in the alga Acetabularia mediterranea. Experientia (Basel) **10**, 215 (1954). — Hämmerling, J.: Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **131**, 1—81 (1934). — Zur Lebensweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen. Arch. Protistenk. **97**, 7—56 (1944). — Nucleus and cytoplasm in Acetabularia. VIII. Congr. Internat. de Botanique, Paris, 1954. C. R. Séances et Rapp. et Communic. déposés lors du Congr. dans la Section 10, p. 87—103, 1957. — Hämmerling, J. u. Ch.: Über Bildung und Ausgleich des Polaritätsgefälles bei Acetabularia. Planta (Berl.) **53**, 522—531 (1959). — Hämmerling, J., H. Clauss, K. Keck, G. Richter and G. Werz: Growth and protein synthesis in nucleated and enucleated cells. Exp. Cell Res. Suppl. **6**, 210—226 (1958). — Lowry, O. H., N. J. Rosebrough, A. L. Farr and R. J. Randall: Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. biol. Chem. **186**, 265—275 (1950). — Lubochinsky, B., et J. P. Zalta: Microdosage Colorimétrique de l'Azote Ammoniacale. Bull. Soc. Chim. biol. (Paris) **36**, 1363—1366 (1954). — Moore, S., and W. H. Stein: Photometric ninhydrin method for use in the chromatography of amino acids. J. biol. Chem. **176**, 367—375 (1948). — Naora, H., G. Richter and H. Naora: Further Studies on the Synthesis of RNA in enucleate Acetabularia mediterranea. Exp. Cell Res. **16**, 134—136 (1959). — Richter, G.: Das Verhalten der Plastidenpigmente in kernlosen Zellen und Teilstücken von Acetabularia mediterranea. Planta (Berl.) **52**, 258—275 (1958). — Die Auswirkungen der Zellkernentfernung auf die Synthese von Ribonukleinsäure und Cytoplasma-Proteinen bei Acetabularia mediterranea. Biochim. biophys. Acta **34**, 407—419 (1959). — Schweiger, H. G., u. H. J. Bremer: Das Verhalten verschiedener P-Fraktionen in kernhaltiger und kernloser Acetabularia mediterranea. Im Druck. — Schweiger, H. G., S. Rapoport, E. Schölzel u. K. Richter: Непосредственное определение аммиака в трихлоруксусных фильтратах форменных элементов крови. (Direkte Ammoniakbestimmung im Trichloressigsäureextrakt von Blutkörperchen.) Вопросы медицинской химии. (Fragen der medizinischen Chemie.) **3**, 65—68 (1957). — Vanderhaeghe, F.: Les Effets de l'Enucléation sur la Synthèse des Protéines chez Acetabularia mediterranea. Biochim. biophys. Acta **15**, 281—287 (1954). — Virtanen, A. J., u. J. Tarnanen: Die enzymatische Spaltung und Synthese der Asparaginsäure. Biochem. Z. **250**, 193—211 (1932). — Werz, G., u. J. Hämmerling: Proteinsynthese in wachsenden und nicht wachsenden kernlosen Zellteilen von Acetabularia. Planta (Berl.) **53**, 145—161 (1959). — Yemm, E. W., and E. C. Cocking: The determination of amino-acids with ninhydrin. Analyst **80**, 209—213 (1955).

Dr. H. J. Bremer und Dr. H. G. Schweiger,
Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling,
Wilhelmshaven, Anton Dohrn-Weg

Planta 55, 22—37 (1960)

Aus dem Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven,
Abteilung Hämmerling

ANREICHERUNG VON RIBONUCLEINSÄURE IN DER WUCHSZONE VON *ACETABULARIA MEDITERRANEA**

Von

GÜNTHER WERZ

Mit 11 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. Februar 1960)

Einleitung

Die Versuche von HÄMMERLING (1934a, b; 1936) zeigten, daß sich die apikale Stielregion der einkernigen *Acetabularia*-Zellen durch starke Wuchs- und Formbildungsleistungen von den basalen Stielregionen unterscheiden. Dieses unterschiedliche Verhalten der verschiedenen Zellregionen ist auf Konzentrationsunterschiede direkt kernabhängiger „morphogenetischer Substanzen" zurückzuführen (HÄMMERLING 1934a, b; 1936; 1953; 1957; J. und CH. HÄMMERLING 1959a, b; Übersicht bei HÄMMERLING u. Mitarb. 1958). Ihre chemische Natur ist bisher unbekannt, doch ist an ihrer Existenz nicht zu zweifeln. Bei dieser Sachlage erschien es erwünscht, zu prüfen, ob es durch cytochemische Methoden möglich ist, apikal-basale Unterschiede in der Verteilung von Substanzen nachzuweisen, deren Bildung kernabhängig ist und die enge Beziehungen zum Wachstum der Acetabularienzelle besitzen.

Aus solchen Versuchen ergab sich, daß in den Stielspitzen z. B. basisches Protein (WERZ 1959 und unveröff.) sowie netzförmig aggregiertes saures Polysaccharid (WERZ, 1960) angereichert ist. Beide Substanzen stehen in enger Beziehung zum Wachstum der Acetabularienzellen und werden nur unter der Wirkung des Zellkernes neu gebildet, jedenfalls auf die Dauer. Zellkernabhängig ist auch die Vermehrung cytoplasmatischer Ribosenucleinsäure (RNS), wie die Versuche von RICHTER (1957; 1959a, b) für *Acetabularia* ergaben. Bei der Bedeutung, die der RNS bei cellulären Prozessen, vor allem Wachstum und Proteinvermehrung zugeschrieben wird (Literatur s. BRACHET 1957 und CASPERSSON 1950), war die Frage von besonderem Interesse, ob in den Wuchszonen der Acetabularienzellen auch eine Anreicherung von RNS erfolgt und wie sie sich unter verschiedenen experimentellen Bedingungen verhält und zwar aus folgendem Grunde.

Nach BRACHET u. Mitarb. (1955, 1956; s. auch BRACHET 1957, 1959) soll sich der RNS-Gehalt nicht nur in kernhaltigen, sondern auch in

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

kernlosen Teilen erhöhen, in den kernlosen Teilen anfänglich (über 8 Tage) sogar stärker als in den kernhaltigen. Außerdem soll sich auch der Proteingehalt in kernlosen Teilen anfänglich (in diesem Falle sogar über 18 Tage) stärker vermehren. BRACHET sah hierin eine besonders instruktive Bestätigung der bekannten Korrelation zwischen RNS-Gehalt und Proteinsynthese. Aber beide Befunde haben sich nicht bestätigen lassen. RICHTER (1957, 1959a, b) zeigte im hiesigen Institut mit Anwendung der modifizierten Methode von OGUR und ROSEN (1950), daß die RNS-Zunahme in kernhaltigen Teilen nach Entfernung des Kernes sofort abgestoppt wird. Diese Ergebnisse wurden in BRACHETs Institut durch NAORA, RICHTER und NAORA (1959) mit Anwendung und Erweiterung der Isotopenverdünnungsmethode, die auch BRACHET u. Mitarb. (1955) angewendet hatten, bestätigt. Was die Proteine betrifft, so können sie zwar in kernlosen Teilen beträchtlich zunehmen (VANDERHAEGHE 1954; WERZ, zit. in HÄMMERLING 1955; BRACHET u. Mitarb. 1955; WERZ und HÄMMERLING 1959; Übersicht in HÄMMERLING u. Mitarb. 1958). Die Nettosynthese bezieht sich auf Chloroplasten- und Cytoplasmaproteine (CLAUSS 1958), sehr wahrscheinlich sogar auf Enzyme (KECK und CLAUSS 1958; CLAUSS 1959). Aber niemals wurde in den zitierten Arbeiten und in zahlreichen weiteren, noch unveröffentlichten Versuchen von WERZ und CLAUSS eine sichere Verstärkung der Proteinzunahme nach Entfernung des Kernes gefunden. Besten Falles ist die Proteinsynthese in den kernlosen Teilen ebenso stark wie in den kernhaltigen Teilen oder schon von Anfang an geringer. Der von BRACHET beschriebene Fall stellt zweifellos einen Ausnahmefall dar. Da also in kernlosen Teilen keine RNS- wohl aber eine beträchtliche (bis zu 9 μg Protein-N reichende) Proteinzunahme erfolgt (s. HÄMMERLING u. Mitarb. 1958, S. 219), schien die Korrelation zwischen RNS-Gehalt und Proteinsynthese aufgehoben. Es war daher von besonderer Wichtigkeit, auf dem hier beschrittenen Wege zu prüfen, ob sie tatsächlich aufgehoben ist.

Material und Methoden

Die Untersuchungen erfolgten an *Acetabularia mediterranea*. Die Versuchspflanzen (ganze kernhaltige Pflanzen, 18—22 mm lang, etwa 10 mm lange kernlose Vorderstücke, sowie ebenso lange kernlose Hinterstücke von 30—40 mm langen Ausgangspflanzen ohne Hüte) wurden unter den von HÄMMERLING (1944) und BETH (1953) angegebenen Kulturbedingungen gehalten (Erd-Schreiberlösung; Licht $\sim$ 2500 Lux, 12 Std täglich; 21° C) oder für die Dunkelversuche ins Dunkle gestellt.

Die Versuchsteile wurden in Carnoy fixiert und solange in 85%igem Äthanol extrahiert, bis sie chlorophyllfrei waren. Ein Teil dieser Pflanzen wurde jeweils 2 Std bei 37° C in Wasser, der andere Teil in Ribonucleaselösung in Wasser [1 mg RN-ase (SCHUCHARDT) je ml] gebracht. (Um die als Verunreinigungen von RN-ase-Präparaten möglicherweise vorhandenen proteolytischen Enzyme zu inaktivieren,

wurde die RN-ase-Lösung vor Verwendung 1 min auf 90° C erhitzt.) Danach wurde mit einer 0,01%igen Lösung von Azur-I (Merck) in Citrat-NaOH-Puffer p_H 5,0 2 min gefärbt und der überschüssige Farbstoff daran anschließend 1 min im selben Puffer ausgewaschen. Aus dem Vergleich der Färbung der nur mit Wasser behandelten Teile mit der Färbung der RN-ase-behandelten Teile ergab sich die Lokalisation von RNS. Entsprechend ausgeführte Färbungen, z. B. mit wäßriger Trypaflavinlösung oder mit Pyronin p_H 4,6, führten zu demselben Ergebnis wie die Azur-I-Färbung. Letzterer wurde jedoch wegen ihrer Brillanz und ihrer besseren photometrischen Auswertbarkeit der Vorzug gegeben.

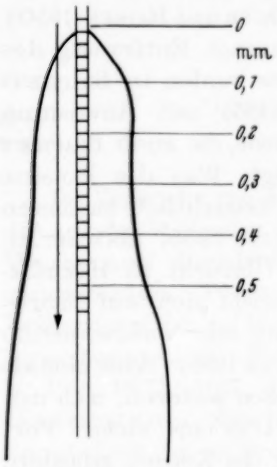


Abb. 1. Schematische Darstellung des Verlaufes der mikrophotometrischen Messungen. 0 = 0% Absorption; → Meßrichtung

Es sei hier hervorgehoben, daß mit der angewendeten Methode nur hochpolymere RNS erfaßt wird. Ebenso sei betont, daß die Frage, ob diese hochpolymere RNS bei *Acetabularia* eine spezifische RNS-Fraktion darstellt, zunächst offen bleibt und auch für das folgende offen bleiben kann. Nucleotide werden bei der Wasserbehandlung extrahiert bzw. hydrolysiert. Das Gleiche gilt für niedrigpolymere RNS. Ob diese aber bei *Acetabularia* vorhanden ist, wurde noch nicht untersucht. Wir werden daher im folgenden nur von RNS sprechen.

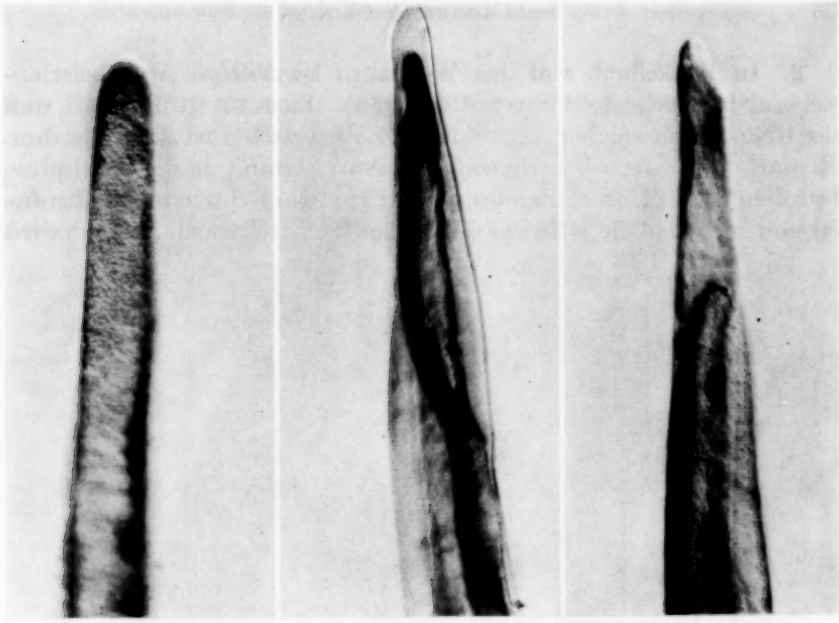
Die Färbung wurde sowohl rein optisch, als besonders durch Messungen im Mikrophotometer beurteilt. Bei diesen ergab sich als relative RNS-Menge die Differenz zwischen der Lichtabsorption einer definierten Flächeneinheit bei 643 mμ der gefärbten, nur wasserbehandelten und der RN-ase-behandelten Teile. Die Messungen erfolgten nur an Stielspitzen und zwar an aufeinanderfolgenden Flächenausschnitten von $6{,}25 \times 10^{-4}$ mm² beginnend an der Stielspitze (vgl. Schema Abb. 1). Bei den Messungen der ersten 25 μ ergaben sich z. T. nicht ausgleichbare Meßfehler, die dadurch entstanden, daß manche Stielspitzen die Meßfläche nicht völlig bedeckten, so daß ein Teil Licht ungehindert auf den Photoreceptor gelangte. Dadurch wurde in diesem Zellbereich eine schwächere Lichtabsorption angezeigt.

Für die Messungen nach dem Ausschlagverfahren diente als Photoreceptor ein CdSe-Photowiderstand hoher Empfindlichkeit, der in ein Doppelspaltokular (Dr. B. Lange, Berlin) montiert war. Die Stabilität der Meßapparatur betrug nach $^1/_2$ Std Anheizzeit mindestens 0,5% (8×10^{-9} A). Die dargestellten Meßergebnisse sind Mittelwerte, die aus Messungen an je 20—25 Teilen erhalten wurden. Die Streuung der Einzelabsorptionswerte war relativ geringfügig. Sie betrug etwa 15%.

Ergebnisse

1. Die Prüfung ganzer, gut wachsender kernhaltiger Zellen von *Acetabularia mediterranea* ergab, daß in den Stielspitzen eine Anreicherung von RNS vorhanden ist (Abb. 2b). Wie die photometrischen Messungen zeigten, ist die RNS-Konzentration in den ersten 0,1 mm am höchsten, um dann schnell auf sehr niedrige Werte abzusinken (Abb. 3).

In Zellen, die aus unbekannten Gründen nicht mehr wuchsen, fehlte eine RNS-Anreicherung (Abb. 2c).



a b c

Abb. 2a—c. RNS-Verteilung in wachsenden (a, b) und nicht mehr wachsenden ganzen Zellen (c) von *A. mediterranea* (a nach RN-ase-Extraktion; b und c unbehandelt)

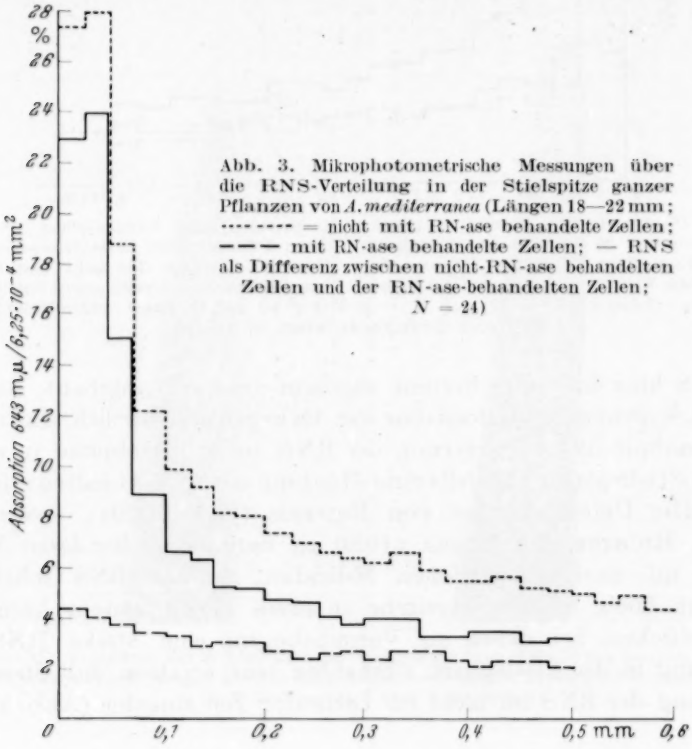


Abb. 3. Mikrophotometrische Messungen über die RNS-Verteilung in der Stielspitze ganzer Pflanzen von *A. mediterranea* (Längen 18—22 mm; ---------- = nicht mit RN-ase behandelte Zellen; — — — mit RN-ase behandelte Zellen; — RNS als Differenz zwischen nicht-RN-ase behandelten Zellen und der RN-ase-behandelten Zellen; $N = 24$)

2. In Dunkelheit wird das Wachstum kern*haltiger* Acetabularienzellen alsbald eingestellt (STICH 1953, 1956). RICHTER (1959a) fand, daß der RNS-Gehalt solcher (kernhaltiger) Zellen rasch und stark abnahm. Es war die Frage, ob auch die RNS-Anreicherung in der Stielspitze betroffen wird. Unsere Ergebnisse sind in Abb. 4 dargestellt. Hieraus erkennt man, daß die RNS aus der Stielspitze verschwand. Zugleich wird

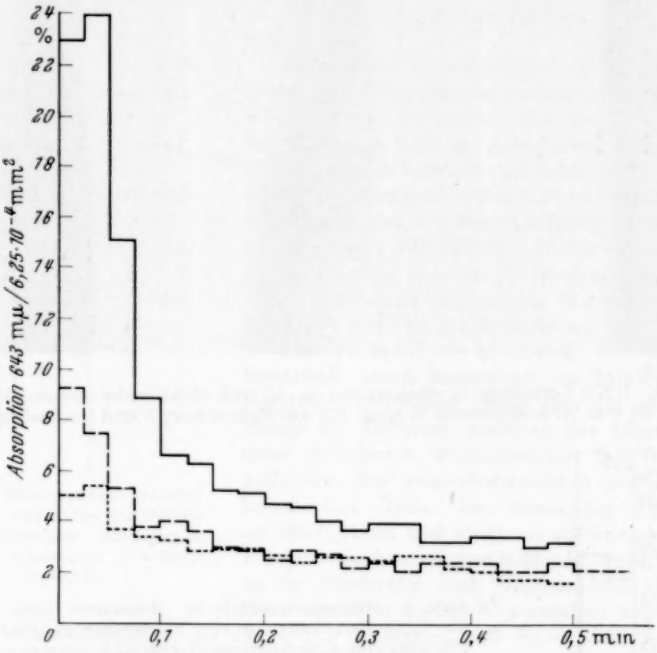


Abb. 4. Photometrische Messungen an den Stielspitzen nicht verdunkelter (———), 10 (– – –) und 20 (····) Tage verdunkelter ganzer Pflanzen von *A. mediterranea*. Die dargestellten Kurven stellen die aus der Differenz: Färbung der nicht mit RN-ase behandelten Kontrollen — Färbung der mit RN-ase extrahierten Zellen errechneten RNS-Werte dar. (Längen 18 bis 22 mm; N = je 23 für 10 und 20 Tage verdunkelte Zellen, für nicht verdunkelte Zellen s. Abb. 3)

die RNS über das ganze System abgebaut oder so umgebaut, daß sie färberisch nicht mehr nachweisbar war. Es ergab sich nämlich, daß neben der Abnahme der Anreicherung der RNS in der Stielspitze in weiter basalen Stielregionen ebenfalls eine Abnahme des RNS-Gehaltes erfolgte.

3. Die Untersuchungen von RICHTER (1957, 1959a), sowie von NAORA, RICHTER und NAORA (1959) an belichteten kern*losen* Zellen zeigten mit zwei verschiedenen Methoden, daß ihr RNS-Gehalt $\pm$ konstant blieb. Unsere Versuche an etwa 10 mm langen kernlosen Vorderstücken, bei denen zu Versuchsbeginn eine starke RNS-Anreicherung in den Stielspitzen vorhanden war, ergaben, daß diese Anreicherung der RNS im Licht im Laufe der Zeit abnahm (Abb. 5). In

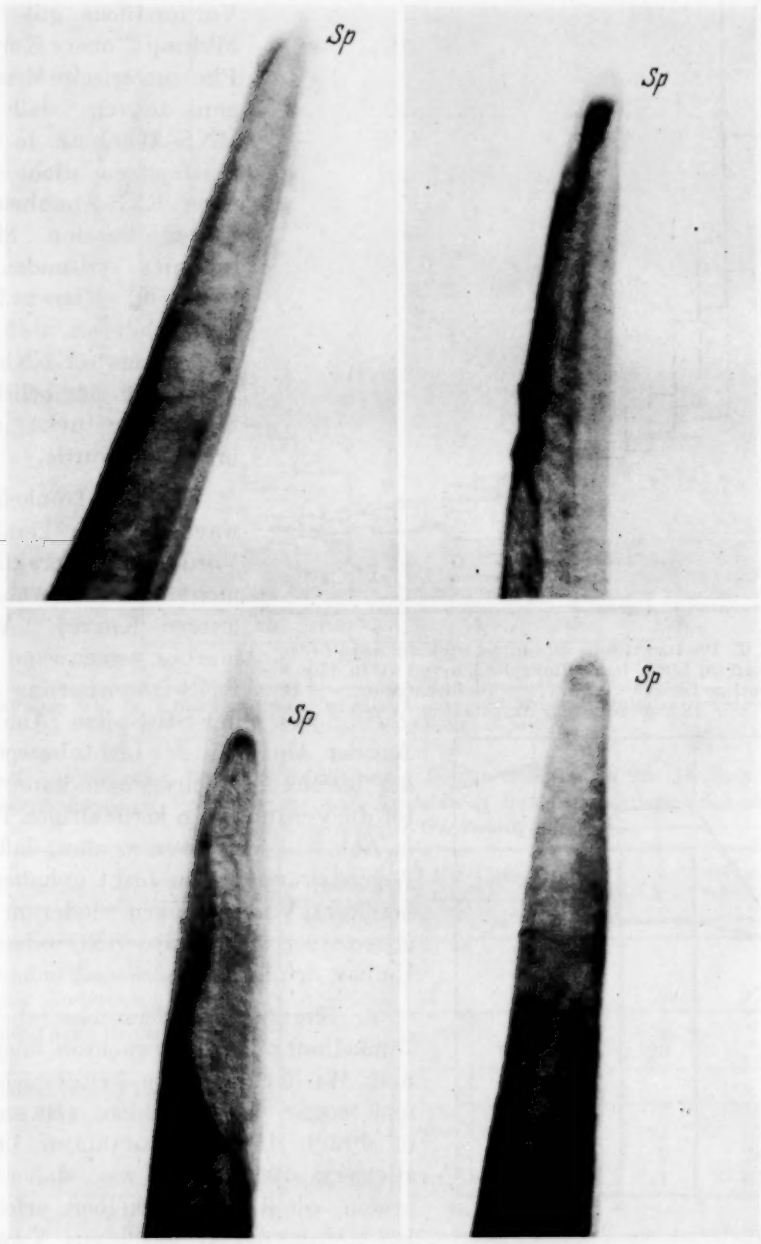


Abb. 5 a—d. Verhalten der Färbbarkeit der Stielspitzen (*Sp*) etwa 10 mm langer, kernloser Vorderstücke im Licht (a nach RN-ase-Extraktion; b—d unbehandelt, b bei Versuchsbeginn; c 10, d 20 Tage nach der Amputation)

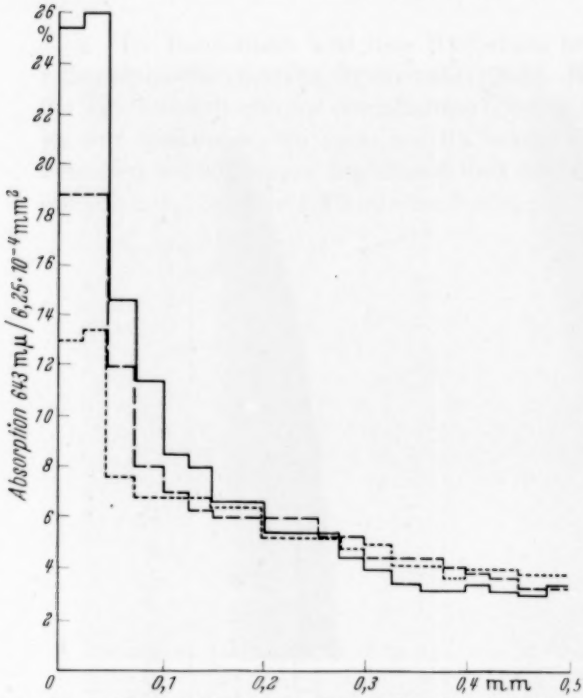


Abb. 6. Photometrische Messungen an kernlosen Vorderstücken im Licht. Darstellung der Kurven wie in Abb. 4. (Jeweilige Längen s. Abb. 7; — Versuchsbeginn; – – 14; ---- 28 Tage nach der Amputation; N je 24)

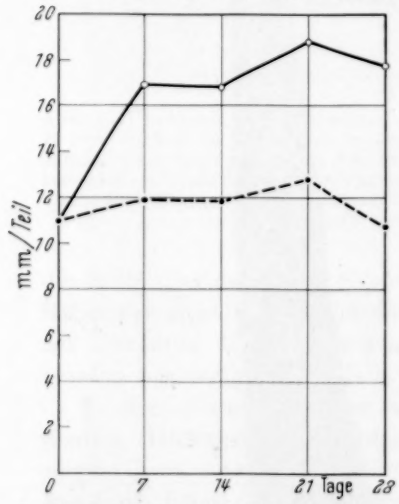


Abb. 7. Wachstumsleistungen (Stiellängenzunahmen) der kernlosen Vorderstücke im Licht ○———○ und in Dunkelheit (●– – –●). (Es wurden nur Vorderstücke ausgewählt, die keine Hüte bildeten)

dieser Zeit wuchsen die Vorderstücke gut (Abbildung 7, obere Kurve). Photometrische Messungen zeigten, daß die RNS-Abnahme in den Stielspitzen nicht mit einer RNS-Abnahme in weiter basalen Stielregionen verbunden ist (Abb. 6). Hieraus läßt sich schließen, daß die angereicherte RNS beim Wachstum der belichteten Vorderstücke „verbraucht" wurde.

4. In Dunkelheit wachsen auch kernlose Vorderstücke praktisch nicht mehr (Abb. 7, untere Kurve). Auch hierbei verschwand die RNS-Anreicherung aus der Stielspitze (Abb. 8). Aus der Abnahme der Lichtabsorption der basaleren Stielregionen kann wie für die verdunkelten kernhaltigen Teile (s. Abb. 2) geschlossen werden, daß im Gegensatz zu den im Licht gehaltenen kernlosen Vorderstücken wiederum ein allgemeiner Abbau der RNS oder ein Umbau erfolgte.

5. Kernlose Vorderstücke, die in Dunkelheit nicht mehr wachsen, können nach Wiederbelichtung weiterwachsen und sogar Hüte bilden (BRACHET u. Mitarb. 1955; HÄMMERLING 1957; RICHTER 1959a). Es war daher zu prüfen, ob die in Dunkelheit erfolgte RNS-Abnahme in kernlosen Vorderstücken nach Wiederbelichtung wieder rückgängig gemacht werden kann. In Tabelle 1 sind Versuche zusammen-

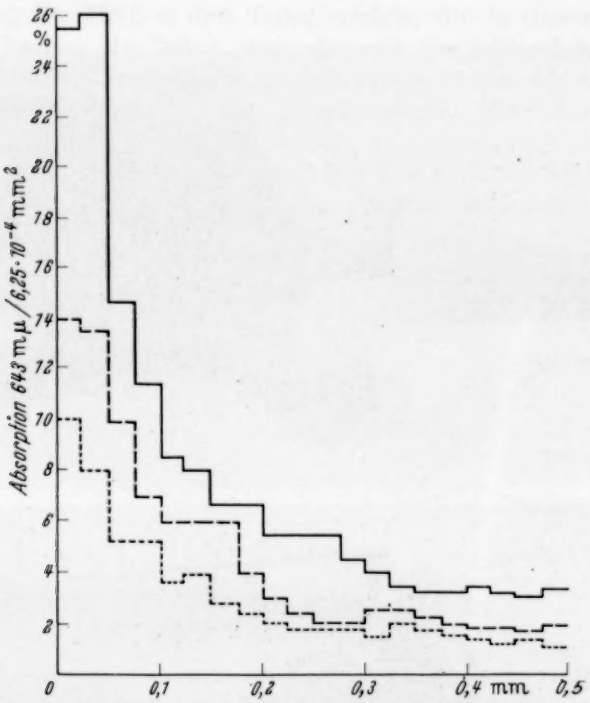
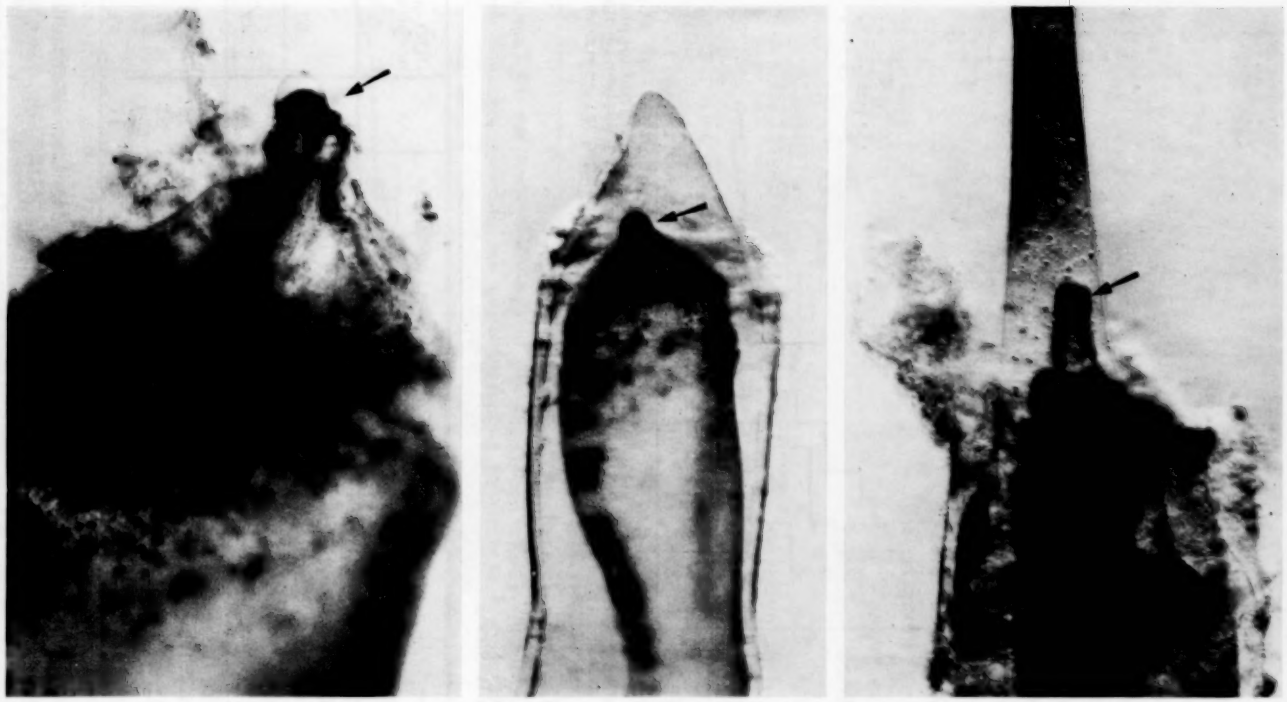


Abb. 8. Photometrische Messungen an verdunkelten kernlosen Vorderstücken. Kurvendarstellung wie in Abb. 4 (Längen s. Abb. 7; ——— Versuchsbeginn; – – – – 14; ..... 28 Tage Dunkelheit; *N* je 23)

Tabelle 1. *Abnahme der RNS-Anreicherung in den Stielspitzen von 10 Tage verdunkelten kernlosen Vorderstücken und Neubildung der Anreicherung nach daran anschließender 5tägiger Wiederbelichtung*

	Stielwuchsleistungen in mm	RNS-Anreicherung			*N*	RNS-Anreicherung
		+	±	−		%
Belichtete Vorderstücke 2 Tage nach Amputation	—	35	1	0	36	97
Vorderstücke 10 Tage Dunkelheit	—	2	11	16	29	7
Vorderstücke 10 Tage Dunkelheit, dann 5 Tage Licht . .	0—1	0	2	10	12	0
	1—3	12	7	2	21	57
	3—5	7	2	0	9	78
	Hutbildg	10	1	0	11	91

gefaßt, bei denen kernlose Vorderstücke für 10 Tage verdunkelt wurden. In dieser Zeit wuchsen die Teile praktisch nicht und es erfolgte eine starke Abnahme ihrer RNS-Anreicherung. Danach wurden die Teile 5 Tage wiederbelichtet. Dabei zeigte sich, daß eine deutliche



a b c

Abb. 9a—c. Aufbau einer RNS-Anreicherung (→) in der Regeneratspitze wuchsfähig gemachter kernloser Hinterstücke (vgl. Text) nach 2 (a) 4 (b) und 6 (c) Tagen Licht. (a doppelt so stark vergrößert wie die übrigen Abbildungen; bei b und c ist der Protoplast kontrahiert)

Anreicherung der RNS in den Teilen erfolgte, die in dieser Zeit gut regeneriert hatten. In Teilen ohne oder mit nur sehr schwacher Regeneration blieb sie aus. Die Befunde zeigen wiederum wie bei ganzen Pflanzen (s. Abb. 1), daß zwischen Wachstum und RNS-Anreicherung eine enge Beziehung besteht[1].

6. Kernlose Hinterstücke sind bekanntlich auch bei Belichtung in der Regel nicht wuchsfähig (HÄMMERLING 1934b). Bei solchen Zellteilen erfolgte keine RNS-Anreicherung. Nach den Versuchen von RICHTER

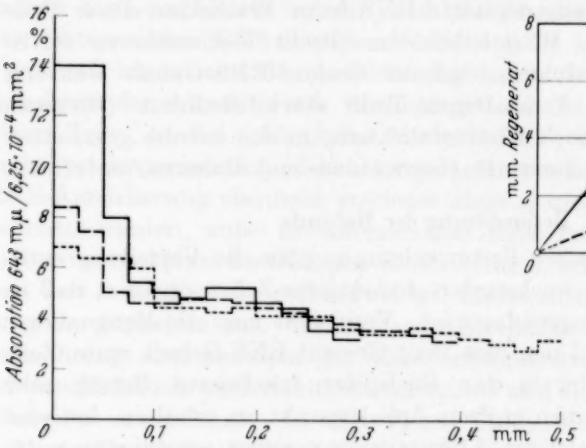


Abb. 10

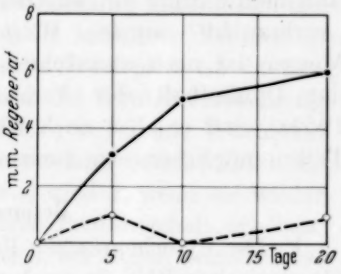


Abb. 11

Abb 10. Photometrische Messungen an den Regeneratspitzen wuchsfähig gemachter kernloser Hinterstücke. Darstellung der Kurven wie in Abb. 4 (—— 7; —— 14; ---- 28 Tage Licht; Längen s. Abb. 11; *N* jeweils 21)

Abb. 11. Wachstumsleistungen (Stiellängenzunahmen) sofort kernloser Hinterstücke (o———o) und von kernlosen Hinterstücken, die von 10 Tage vorverdunkelten kernhaltigen Hinterstücken erhalten wurden (●———●)

(1957, 1959a) bleibt auch in diesen Teilen der Gesamt-RNS-Gehalt erhalten. Die Photosynthese allein führt also noch nicht zu einer RNS-Anreicherung, das kernlose Teilstück muß auch wuchsfähig sein. Das geht auch aus dem folgenden Experiment hervor.

7. Werden den Hinterstücken im Dunkeln die kernhaltigen Rhizoide belassen, so wachsen sie ebenfalls nicht aus. Es wird in ihnen aber ein starkes Wuchsvermögen induziert (J. und CH. HÄMMERLING 1959a, b). Nach Amputation des zellkernhaltigen Rhizoides und anschließender Wiederbelichtung der nunmehr kernlosen Hinterstücke zeigen diese nämlich fast ebenso gute Wuchsleistungen (vgl. Abb. 11) wie kernlose,

[1] Ergänzend durchgeführte Untersuchungen über das Verhalten von azocarmin-B-positivem Protein in verdunkelten, kernlosen Vorderstücken (WERZ 1959) zeigten, daß auch dieses — wie die RNS — in Dunkelheit aus der Stielspitze verschwindet, nach Wiederbelichtung der Teile in der Stielspitze aber wiederangereichert wird.

stets belichtete Vorderstücke (vgl. Abb. 7). Wir untersuchten Teile, die 10 Tage kernhaltig im Dunkeln gehalten worden waren. Es ergab sich, daß bei den daran anschließend wiederbelichteten kernlos gemachten Hinterstücken in deren Regeneraten RNS sofort angereichert wurde (Abb. 9). Diese Anreicherung aber nahm im Laufe der Zeit wieder ab (Abb. 10). Die photometrischen Messungen an den Stielspitzen führten zu dem Schluß, daß — analog dem Verhalten in kernlosen, stets belichteten Vorderstücken — ein Abbau der RNS nicht stattfand, sondern daß auch hierbei die angereicherte RNS beim Wachstum dieser Teile „verbraucht" wurde. Hinsichtlich der direkt bestimmbaren RNS-Mengen ist noch anzuführen, daß der Gesamt-RNS-Gehalt während der Dunkelhaft der kernhaltigen Teile stark abnimmt (RICHTER 1959a), daß er aber nach Wiederbelichtung in den kernlos gemachten Teilen möglicherweise zunimmt (SCHWEIGER und BREMER, unveröff.).

Besprechung der Befunde

1. Die cytochemischen Untersuchungen über die Verteilung cytoplasmatischer RNS in wachsenden *Acetabularia*-Zellen ergaben, daß in der Stielspitze RNS angereichert ist. Vergleicht man die Menge dieser RNS in den ersten 0,1 mm mit dem Gesamt-RNS-Gehalt eines Zellteiles, so erscheint der in der Stielspitze lokalisierte Betrag sehr gering. Um hierfür einen groben Anhaltspunkt zu erhalten, bezogen wir die aus unseren relativen Absorptionsmessungen errechneten mittleren Extinktionswerte für die hier nachgewiesene RNS (s. S. 25) in den ersten 0,1 mm und den 0,1 mm der basaleren Stielpartien (Abb. 6) auf die mit rein chemischen Methoden erhaltenen Gesamt-RNS-Werte von RICHTER (1959a, Fig. 7). Danach ergab sich für etwa 12 mm lange kernlose Vorderstücke, daß in der Stielspitze etwa 4 % der Gesamt-RNS lokalisiert sind, was ungefähr 0,015 μg RNS entspräche.

Bei der Überschlagsrechnung gingen wir davon aus, daß 12 mm lange kernlose Vorder- oder Hinterstücke etwa 0,4 μg Gesamt-RNS enthalten. Auf die daraus erhaltenen 0,0033 μg RNS/0,1 mm bezogen wir den aus der mittleren Lichtabsorption von 4—5 % erhaltenen Extinktionswert von 0,02 der basalen Stielpartien. Aus der mittleren Lichtabsorption der 0,1 mm Stielspitze (19 %) ergab sich eine Extinktion von 0,09. Unter Zugrundelegung dieser Daten errechnete sich der RNS-Gehalt für 0,1 mm der Stielspitze zu 0,0149 μg, d. s. 3,7 % der Gesamt-RNS.

2. Besonders nach den ersten Untersuchungen von BRACHET (Literatur in 1957) und CASPERSSON (Literatur in 1950) besteht eine vielfach bestätigte Korrelation zwischen dem RNS-Gehalt und der Proteinvermehrung in wachsenden bzw. sich teilenden oder stark Protein sezernierenden Zellen. Eine solche Beziehung besteht auch bei kernhaltigen, wachsenden Zellen von *Acetabularia*. Nach den Versuchen von RICHTER (1959a) schien sie jedoch in kernlosen Zellen entkoppelt. RICHTER fand, daß in den belichteten kernlosen Zellen wohl eine z. T. beträchtliche Proteinzunahme stattfand (vgl. auch VANDERHAEGHE 1954; BRACHET

u. Mitarb. 1955; CLAUSS 1958; WERZ und HÄMMERLING 1959), der RNS-Gehalt aber ± konstant blieb, beides sowohl für wuchsfähige als auch für nicht wuchsfähige Teile geltend. Es erhob sich daher, wie in der Einleitung schon ausgeführt, die Frage, ob aus der Konstanz der RNS-Menge in einer kernlosen Zelle darauf geschlossen werden kann, daß eine Beziehung der RNS-Menge zur Proteinvermehrung, bzw. zum Wachstum nicht mehr besteht. Diese Frage war mit den rein chemischen Methoden nicht lösbar gewesen. Aus unseren cytochemischen Versuchen kann geschlossen werden, daß diese Beziehung hinsichtlich der hier untersuchten RNS bestehen bleibt: a) In kernlosen belichteten Vorderstücken nimmt die Anreicherung in der Stielspitze ab — entsprechend der Abnahme des Wachstums und der Proteinvermehrung dieser Teile. b) Bei *verdunkelten* Vorderstücken, bei denen Wachstum und Proteinvermehrung alsbald eingestellt werden, verschwindet die RNS-Anreicherung ebenfalls, erscheint aber c) wieder, wenn sie wieder belichtet werden, wobei sie wachsen und ihren Proteingehalt erhöhen. d) Bei verdunkelten *kernhaltigen* Hinterstücken, bei denen kein Wachstum und keine Proteinzunahme erfolgt, bleibt auch die RNS-Anreicherung am Stielende aus. Wächst ein Hinterstück aber unter Proteinvermehrung aus, nachdem der Kern entfernt war und das nunmehr *kernlose* Teilstück wiederbelichtet wurde, so wird e) sogleich RNS in der Stielspitze angereichert. In allen diesen Fällen besteht also eine deutliche positive Korrelation zwischen Vorhandensein bzw. Aufbau der RNS-Anreicherung und dem Wachstum sowie der Proteinvermehrung. Diese Korrelation wird seit den grundlegenden Untersuchungen BRACHETs und CASPERSSONs so gedeutet, daß der Grad der Proteinsynthese vom RNS-Gehalt *abhängig* ist. Die hier beschriebenen Versuche fügen sich besonders gut in diese Deutung ein, da die Stielspitze zugleich der Ort besonders intensiver Proteinbildung ist.

Ungeklärt bleibt der Fall der von Anfang an kernlosen belichteten Hinterstücke. Diese wachsen nicht aus und dementsprechend fehlt die RNS-Anreicherung. Aber auch in diesen Teilen erfolgt eine beträchtliche Proteinvermehrung (WERZ und HÄMMERLING 1959). Indessen könnte diese über das ganze Teilstück ± gleichmäßig verteilt erfolgen. Sollte also hochpolymere RNS im Spiele sein, so könnte sie auch diffus verteilt bleiben.

3. Als nächstes erhebt sich die Frage, ob in den Fällen, bei denen sich eine RNS-Anreicherung an der Stielspitze kernloser Teile ausbildet, diese Zunahme auf einer Neubildung von RNS beruht oder auf einer Akkumulation derjenigen RNS, die sich in den hinteren Stielpartien befand. Im ersten Falle würde cytoplasmatische RNS-Nettosynthese bei Fehlen des Kernes vorliegen, eine Frage, die durch die Versuchsergebnisse RICHTERs — keine meßbare Gesamt-RNS-Zunahme nach Entfernung des Kernes — nicht als bereits negativ entschieden angesehen werden darf. In unseren Versuchen wurde die Entstehung einer RNS-Anreicherung in zwei Fällen beobachtet: bei den

kernlosen, vorverdunkelten und wiederbelichteten Vorderstücken, sowie bei den nach Wiederbelichtung auswachsenden kernlosen Hinterstücken, die zuvor als kernhaltige Teile verdunkelt waren. In beiden Fällen ist durchaus die Möglichkeit gegeben, daß die Anreicherung durch Neubildung von RNS zustande kommt, zumal ja während der Dunkelhaft deren Gehalt und nach den Ergebnissen RICHTERS auch der Gesamtgehalt an RNS erheblich abnimmt. Jedoch kann die andere Möglichkeit hierdurch nicht als ausgeschlossen gelten, daß also die Anreicherung auf Akkumulation der noch vorhandenen RNS beruht. Welche der beiden Möglichkeiten auch zutreffen möge, auf jeden Fall zeigt sich, daß die aus einem kernlosen Teilstück auswachsenden Stiele nicht RNS-los sind, eine Möglichkeit, mit der neben anderen insofern gerechnet werden mußte, als ja der ursprünglich nur im Mutterstück lokalisierte RNS-Gehalt keine meßbare Erhöhung erfährt, also die vorhandene RNS möglicherweise dort lokalisiert bleiben könnte.

4. Bei allen verdunkelten kernlosen Teilen, die zu Versuchsbeginn eine Anreicherung von RNS an der Stielspitze besaßen, verschwindet nicht nur diese, sondern auch in den hinteren Stielpartien nimmt ihr Gehalt ab. Offenbar handelt es sich um einen durch das Fehlen der Photosynthese bedingten Gesamtabbau. Bei allen belichteten und wachsenden kernlosen Teilen dagegen verschwindet nur die Anreicherung an der Stielspitze, während der Gehalt in den mehr basalen Stielpartien gleichbleibt. Dieser Umstand läßt sich wohl am besten so verstehen, daß der in der Stielspitze lokalisierte Anteil beim bzw. durch das Wachstum und die damit verbundene Proteinvermehrung verbraucht wird. Für einen solchen „Verbrauch" spricht auch das Verhalten der ganzen kernhaltigen Zellen; denn bei ihnen wird die Konzentration der RNS in der Stielspitze im Laufe des linearen Wachstums nicht erhöht.

Da in den belichteten kernlosen Vorderstücken der verbrauchte Anteil der in der Spitze angereicherten RNS nicht durch Nachschub von hinten ersetzt wird, so spricht das wiederum dafür, daß die Ausbildung einer Anreicherung auf cytoplasmatischer Neubildung von RNS beruhen dürfte.

5. Polare Gradienten der RNS-Verteilung sind auch von anderen Organismen bekannt [z. B. BRACHET 1948, 1952, 1957 (hier auch weitere Literatur); STEINERT 1951; TAKATA 1953]. Sie folgen, wie besonders die Versuche an Amphibienkeimen zeigten, einem „morphogenetischen Gradienten" (z. B. STEINERT 1953). Auch bei *Acetabularia* ist an den Stellen, an denen die Konzentration der „morphogenetischen Substanzen" bzw. das Wachstum am höchsten ist, nämlich in der Stielspitze (HÄMMERLING 1936), RNS angereichert. Sie fehlte, wenn eine Zelle nicht mehr weiterwuchs, oder wurde vermindert, wenn das Wuchsvermögen — wie im Falle der kernlosen Vorderstücke — allmählich abnahm.

Die RNS ist jedoch nicht die einzige Substanz, die ein derart ausgeprägtes Verhalten bei der Morphogenese besitzt. Untersuchungen

an verschiedenen Objekten ergaben, daß entsprechende Gradienten in der Verteilung der SH-Gruppen von Proteinen (z. B. BRACHET 1938), von hexonbasenreichen Proteinen (CASPERSSON und THORELL 1941), Wuchsstoffen (SKOOG 1938; SÖDING 1952; THIMANN 1955; WENT 1932, 1941) und verschiedenen Enzymsystemen (z. B. LEHMANN 1952) bestehen. Bei unserem Objekt fand sich in den Wuchszonen, wie bereits eingangs angeführt, angereichertes basisches Protein (WERZ 1959 und unveröff.). Seine Verteilung und sein Verhalten in der Acetabularienzelle entspricht der hier nachgewiesenen RNS. Trotz dieser auffälligen Übereinstimmung bedarf es jedoch einer speziellen Prüfung zur Aufklärung der Frage, ob die beiden Substanzen in funktioneller Beziehung — z. B. als Nucleoproteid — zueinander stehen, ebenso, in welchen Beziehungen sie zu den „morphogenetischen Substanzen" stehen. Eine Identifizierung mit diesen ist zur Zeit nicht möglich, und zwar aus denselben Gründen, die schon für basische Proteine erörtert wurden (WERZ 1959).

Wie die erörterten Fragen sich auch aufklären mögen, auf jeden Fall stehen die basischen Proteine, aber auch die cytochemisch nachweisbare RNS in enger Beziehung zu den Primärvorgängen, durch die Wachstum induziert wird. Wie es in dieser Hinsicht mit Protoplasten-Strukturierungen steht, die sehr wahrscheinlich aus saurem Polysaccharid aufgebaut sind, soll in der hier anschließenden Arbeit erörtert werden (WERZ 1960).

Zusammenfassung

Die Verteilung und das Verhalten hochpolymerer cytoplasmatischer RNS in *Acetabularia mediterranea* wurde untersucht.

1. Es ergab sich, daß in normal wachsenden Zellen eine starke RNS-Anreicherung in der Stielspitze vorhanden war. In Zellen, die nicht mehr weiterwuchsen, fehlte diese Anreicherung.

2. Pflanzen, deren Wachstum und Proteinvermehrung durch Dunkelheit sistiert war, zeigten eine Abnahme der angereicherten RNS. Dies gilt sowohl für kernhaltige als auch für kernlose Zellen. Die Abnahme beruht vermutlich auf einem RNS-Abbau.

3. Der Abbau der RNS-Anreicherung in verdunkelten Teilen war reversibel, wie Versuche an 10 Tage vorverdunkelten und danach 5 Tage wiederbelichteten kernlosen Vorderstücken ergaben.

4. In kernlosen Vorderstücken im Licht nahm die RNS der Stielspitze ebenfalls ab. Es zeigte sich aber, daß diese Abnahme nicht wie bei den verdunkelten Teilen auf einem „Abbau" beruhte, sondern daß vermutlich RNS bei den Wachstumsprozessen bzw. der Proteinvermehrung dieser Teile „verbraucht" wurde.

5. Bei der Untersuchung unter der Wirkung des Zellkernes wuchsfähig gemachter kernloser Hinterstücke ergab sich, daß der Aufbau der RNS-Anreicherung nicht von der Gegenwart des Zellkernes abhängig

ist, sondern als Folge einer auch in Dunkelheit abgelaufenen Kernwirkung auf das Cytoplasma betrachtet werden kann.

6. Hinsichtlich der direkt bestimmbaren Gesamt-RNS findet in kernlosen Teilen anscheinend eine Entkoppelung von RNS-Gehalt und Proteinzunahme statt (wohl noch Proteinzunahme, aber keine RNS-Zunahme mehr). Hinsichtlich der hier nachgewiesenen hochpolymeren RNS bleibt die Korrelation jedoch erhalten: bei wachsenden kernlosen Teilen mit Proteinzunahme findet sich stets auch hochpolymere RNS in der Stielspitze angereichert. Wegen dieser räumlichen Korrelation passen die Befunde besonders gut in die Theorie der Abhängigkeit des Grades der Proteinsynthese vom RNS-Gehalt hinein.

7. Es wird die Frage erörtert, ob der Aufbau einer RNS-Anreicherung durch Akkumulation bereits vorhandener hochpolymerer RNS erfolgt oder auf Grund von Neusynthesen hochpolymerer RNS im Cytoplasma gebildet wird. Eine Entscheidung ist nicht möglich. Jedoch zeigt sich, daß die aus kernlosen Mutterstücken zuwachsenden Zellteile nicht RNS-los sind. Damit ist eine in den Richterschen Versuchen enthaltene Möglichkeit ausgeschlossen.

Literatur

BETH, K.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen *Acetabularia*-Zellen. Z. Naturforsch. 8b, 334 (1953). — BRACHET, J.: La localisation des protéines sulfhydrilées pendant le développement des amphibiens. Bull. Acad. roy. Belg. **6/7**, 499 (1938). — The metabolism of nucleic acids during embryonic development. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **12**, 18 (1948). — Le rôle des acides nucléiques dans la vie de la cellule et de l'embryon. Paris: Masson & Cie. 1952. — Biochemical cytology. New York: Academic Press Inc. 1957. — Ribonucleinsäure und Proteinsynthese. In: Handbuch der Histochemie. III. Nucleoproteide. Stuttgart: Gustav Fischer 1959. — BRACHET, J., and H. CHANTRENNE: The function of the nucleus in the synthesis of cytoplasmic proteins. Cold Spr. Harb. Symp. quant. Biol. **21**, 329 (1956). — BRACHET, J., H. CHANTRENNE et F. VANDERHAEGHE: Recherches sur les interactions biochimiques entre le noyau et le cytoplasme chez les organismes unicellulaires. II. *Acetabularia mediterranea*. Biochim. biophys. Acta **18**, 544 (1955). — CASPERSSON, T.: Cell growth and cell function. New York: Norton 1950. — CASPERSSON, T., u. B. THORELL: Der endozelluläre Eiweiß- und Nukleinsäurestoffwechsel in embryonalem Gewebe. Chromosoma (Berl.) **2**, 132 (1941). — CLAUSS, H.: Über quantitative Veränderungen der Chloroplasten- und cytoplasmatischen Proteine in kernlosen Teilen von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **52**, 334 (1958). — Das Verhalten der Phosphorylase in kernhaltigen und kernlosen Teilen von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **52**, 534 (1959). — ERRERA, M., et F. VANDERHAEGHE: Effets des rayons u. v. sur *Acetabularia mediterranea*. Exp. Cell Res. **13**, 1 (1957). — HÄMMERLING, J.: Regenerationsversuche an kernhaltigen und kernlosen Zellteilen von *Acetabularia Wettsteinii*. Biol. Zbl. **54**, 650 (1934a). — Über formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **131**, 1 (1934b). — Studien zum Polaritätsproblem. Zool. Jb. **56**, 441 (1936). — Zur Lebensweise, Fort-

pflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen. Arch. Protistenk. **97**, 7 (1944). — Nucleo-cytoplasmic relationship in the development of *Acetabularia*. Int. Rev. Cytol. **2**, 475 (1953). — Nucleus and Cytoplasm in *Acetabularia*. 8. Congr. Internat. de Botan. Paris. Compt rend. des Séances et Rapp. et Communic. déposés lors du Congr. dans la Section **10**, 87 (1957). — HÄMMERLING, J., H. CLAUSS, K. KECK, G. RICHTER and G. WERZ: Growth and protein synthesis in nucleated and enucleated cells. Exp. Cell Res. Suppl. **6**, 210 (1958). — HÄMMERLING, J. u. CH.: Kernaktivität bei aufgehobener Photosynthese. Planta (Berl.) **52**, 516 (1959a). — Über Bildung und Ausgleich des Polaritätsgefälles bei *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 522 (1959b). — KECK, K., and H. CLAUSS: Nuclear Control of Enzyme synthesis in *Acetabularia*. Bot. Graz. **120**, 43 (1958). — LEHMANN, F. E.: Mikroskopische und chemische Organisation der Zelle. 1952. Aus E. BÜNNING, Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanze, 3. Aufl. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1953. — NAORA, H., G. RICHTER and H. NAORA: Further studies on the synthesis of RNA in enucleate *Acetabularia mediterranea*. Exp. Cell Res. **16**, 434 (1959). — OGUR, M., and G. ROSEN: The nucleic acids of plant tissues. I. The Extraction and Estimation of desoxypentose nucleic acid and pentose nucleic acid. Arch. Biochem. **25**, 262 (1950). — RICHTER, G.: Zur Frage der RNS-Synthese in kernlosen Teilen von *Acetabularia*. Naturwiss. **44**, 520 (1957). — Die Auswirkungen der Zellkernentfernung auf die Synthese von Ribonucleinsäure und Cytoplasma-Proteinen bei *Acetabularia mediterranea*. Biochim. biophys. Acta **34**, 407 (1959a). — Die Auslösung kerninduzierter Regeneration bei gealterten kernlosen Zellteilen von *Acetabularia* und ihre Auswirkungen auf die Synthese von Ribonucleinsäure und Cytoplasmaproteinen. Planta (Berl.) **52**, 554 (1959b). — SKOOG, F.: Absorption and translocation of auxin. Amer. J. Bot. **25**, 361 (1938). — SÖDING, H.: Die Wuchsstofflehre. Stuttgart: Georg Thieme 1952. — STEINERT, M.: Bull. Soc. Chim. biol. **33**, 549 (1959). Aus J. BRACHET, Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957. — Metabolisme de l'acide ribonucléique dans l'oeuf d'amphibien traité au dinitrophenol. Biochim. biophys. Acta **10**, 427 (1953). — STICH, H.: Der Nachweis und das Verhalten von Metaphosphaten in normalen, verdunkelten und trypaflavinbehandelten Acetabularien. Z. Naturforsch. 8b, 36 (1953). — Änderungen von Kern und Polyphosphaten in Abhängigkeit von dem Energiegehalt des Cytoplasmas bei *Acetabularia*. Chromosoma (Berl.) **7**, 693 (1956). — TAKATA, A.: Biol. Bull. **105**, 348 (1953). Aus J. BRACHET, Biochemical cytology. New York: Academic Press 1957. — THIMANN, K. V., and A. C. LEOPOLD: Plant growth hormones. In: The hormones, vol. 3, p. 1. New York: Academic Press 1955. — VANDERHAEGHE, F.: Les effets de l'énucléation sur la synthèse des protéines chez *Acetabularia mediterranea*. Biochim. biophys. Acta **15**, 281 (1954). — WENT, F. W.: Eine botanische Polaritätstheorie. Jb. wiss. Bot. **76**, 528 (1932). — Polarity of auxin transport in inverted *Tagetes* cuttings. Bot. Gaz. **103**, 386 (1941). — WERZ, G.: Über polare Plasmaunterschiede bei *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 502 (1959). — Über Strukturierungen der Wuchszonen von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **55**, 38—56 (1960). — WERZ, G., u. J. HÄMMERLING: Proteinsynthese in wachsenden und nichtwachsenden kernlosen Zellteilen von *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 145 (1959).

Dr. GÜNTHER WERZ,
Max-Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling,
Wilhelmshaven, Anton Dohrn-Weg

Planta 55, 38—56 (1960)

Aus dem Max Planck-Institut für Meeresbiologie, Wilhelmshaven,
Abteilung Hämmerling

ÜBER STRUKTURIERUNGEN DER WUCHSZONEN VON *ACETABULARIA MEDITERRANEA**

Von

GÜNTHER WERZ

Mit 13 Textabbildungen

(Eingegangen am 11. März 1960)

Einleitung

Wird der Stiel der einkernigen Acetabularienzelle in kernlose Einzelstücke zerlegt, so findet man bekanntlich von apikal nach basal abnehmende Wuchsleistungen dieser kernlosen Teile. Nach allen unseren Kenntnissen sind diese unterschiedlichen Wuchsleistungen bedingt durch apikal-basale Konzentrationsunterschiede „morphogenetischer Substanzen" (HÄMMERLING 1934a, b, 1936, 1953, 1957; HÄMMERLING u. Mitarb. 1958; J. und CH. HÄMMERLING 1959a, b). Obwohl ihre chemische Natur bislang unbekannt geblieben ist, ist an ihrer Existenz bisher kein Zweifel aufgetaucht. Ihre primäre Wirkung muß darin gesehen werden, daß sie den Stiel zum Auswachsen bringen, bzw. bei apikalen Teilen zum Weiterwachsen. Es erschien daher erwünscht, möglichst nahe an die Primärvorgänge des Wachstums heranzukommen. Sich hierauf beziehende Untersuchungen haben bisher ergeben, daß in wachsenden Stielspitzen (ebenso in auswachsenden Wirteln und Hüten) basische Proteine, die mit Azocarmin-B bei *pH* 2 (WERZ 1959) und Fast Green bei *pH* 8,6 (WERZ, unveröff.) angefärbt werden können, sowie Ribosenucleinsäure (WERZ 1960) angereichert sind. Die folgenden Untersuchungen sollen zeigen, daß beim Spitzenwachstum der Acetabularienzelle auch charakteristische Strukturierungen der Wuchszone erfolgen. Außerdem wurde versucht zu prüfen, wie ihre Bildung erfolgt und welches physiologische Verhalten sie unter verschiedenen experimentellen Bedingungen zeigen. Durch cytochemische Reaktionen wurde weiterhin versucht, die chemische Natur der Struktursubstanzen näher zu charakterisieren.

Material und Methoden

Für die Untersuchungen wurden ~ 10 mm lange, kernhaltige und kernlose Hinterstücke sowie ebenso lange kernlose Vorderstücke von *Acetabularia mediterranea* verwendet. Die Ausgangspflanzen hatten Stiellängen von 50—70 mm und standen kurz vor der Hutbildung. Für die Versuche konnten Pflanzen

* Mit Unterstützung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft.

verschiedener Nachzuchten verwendet werden, da die Strukturierung bei allen *mediterranea*-Pflanzen in ihrer charakteristischen Ausprägung gefunden wurde. Die Versuchsteile wurden in der von HÄMMERLING (1944) und BETH (1953) angegebenen Weise in Erdschreiberlösung gehalten (21° C; Licht ~ 2500 Lux, 12 Std täglich).

Die Untersuchungen erfolgten, falls nicht anders angegeben, an carnoy-fixierten Teilen (Alkohol-Chloroform-Eisessig: 6:3:1; 20 min bei + 4° C). Die chlorophyllfreien Teile wurden dann mit Trypsin (Merck; 1 mg/ml Borat-HCl-Puffer *pH* 8,0) 4 Std bei 37° C behandelt und anschließend mit einer 0,01%igen Lösung von Azur-I (Merck) im selben Puffer 1 min gefärbt und daran anschließend in der Pufferlösung vom überschüssigen Farbstoff ausgewaschen. Um für die Beobachtung stärkere Kontraste zu erhalten, wobei allerdings Feinheiten der Strukturen verlorengingen, wurde im Anschluß an die Differenzierung 30 sec mit einer J-KJ-Lösung in Puffer (1 ml Lugolsche Lösung + 9 ml Borat-HCl-Puffer *pH* 8) behandelt. Dadurch treten die ohne Jodierung metachromatisch gefärbten Strukturen in dunkelbrauner Färbung deutlich hervor.

Weitere Methoden, besonders die, die zur cytochemischen Charakterisierung der Strukturensubstanzen angewendet wurden, sind in den betreffenden Abschnitten aufgeführt.

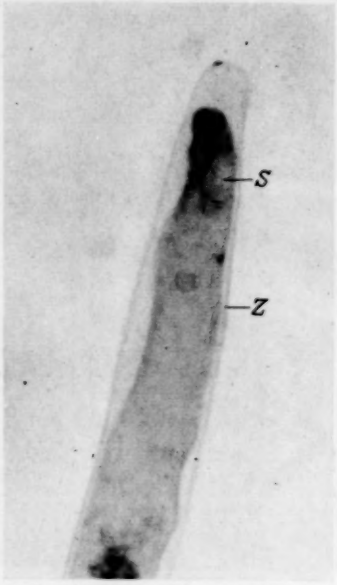


Abb. 1. Stielspitze von *Acetabularia mediterranea* nach Trypsinbehandlung und Färbung mit Azur-I bei *pH* 8. *S* Protoplastenstrukturierung; *Z* Zellmembran

Ergebnisse

1. Färbung von Strukturierungen im Protoplasten und ihre polare Anordnung in kernhaltigen Zellen

In vivo unterscheidet sich die Stielspitze der Acetabularienzelle von den folgenden Stielregionen durch ein „dichteres" Plasma und kleine Chloroplasten oder Chloroplastenvorstufen. Eine charakteristische Strukturierung des Protoplasten ist nicht erkennbar. In fixierten Teilen können, wie schon angeführt wurde, polar angereicherte Substanzen angefärbt werden: außer basischen Proteinen, die als Indicator für Unterschiede in der Plasmaqualität angesehen werden können (WERZ 1959 und unveröff.) auch Ribosenucleinsäure (WERZ 1960).

Spezielle Strukturunterschiede waren auch auf diesem Wege nicht festzustellen. Sie ließen sich auf dem folgenden Wege ermitteln. Werden die mit Carnoy fixierten Teile mit Azur-I bei *pH* 8 gefärbt, so ist der Protoplast der Stielspitze orthochromatisch gefärbt. Nach Proteolyse durch Trypsin war die orthochromatische Färbung nicht mehr vorhanden. An ihre Stelle war eine stark metachromatische Reaktion der Spitzenregion des Stieles getreten (Abb. 1). Sie erwies sich bei stärkerer Vergrößerung als strukturgebunden.

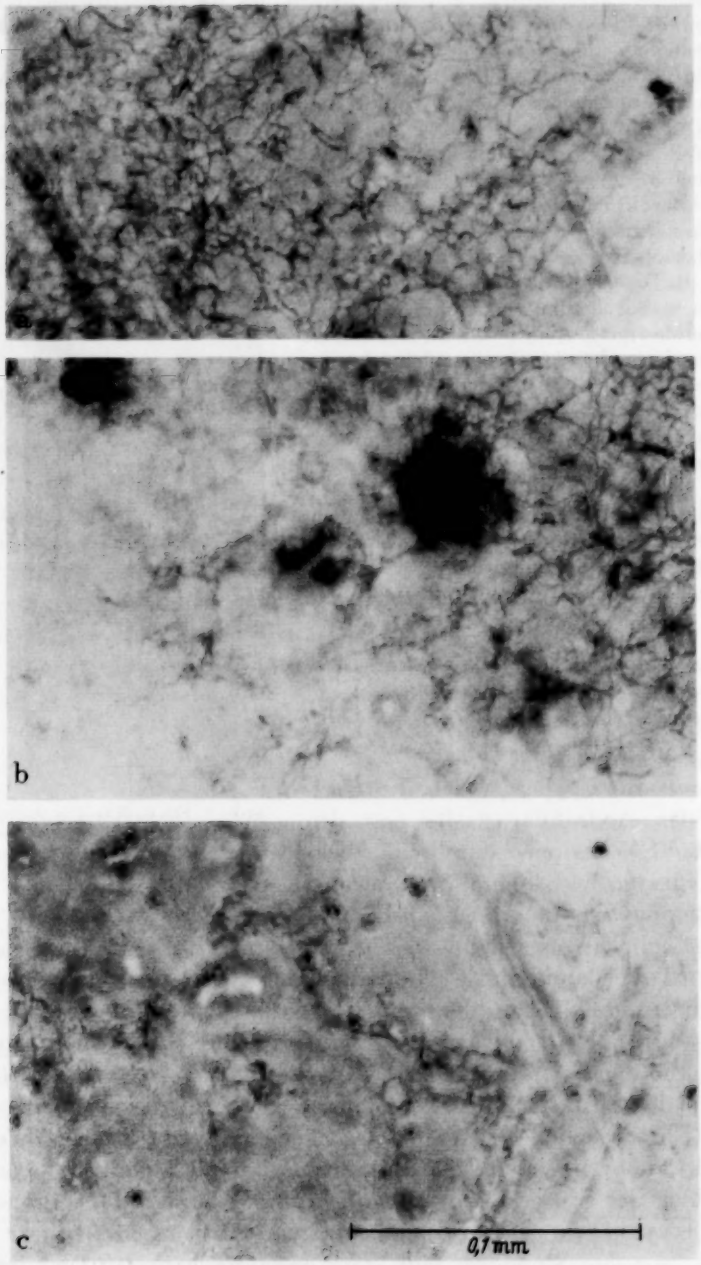


Abb. 2. Protoplastenstruktur in stärkerer Vergrößerung; Strukturbestanzen nicht jodiert. a—c etwa 0,5, 2 und 3 mm unterhalb der Stielspitze. Bei c ist die Textur mehr oder weniger stark in Einzelfibrillen aufgelöst

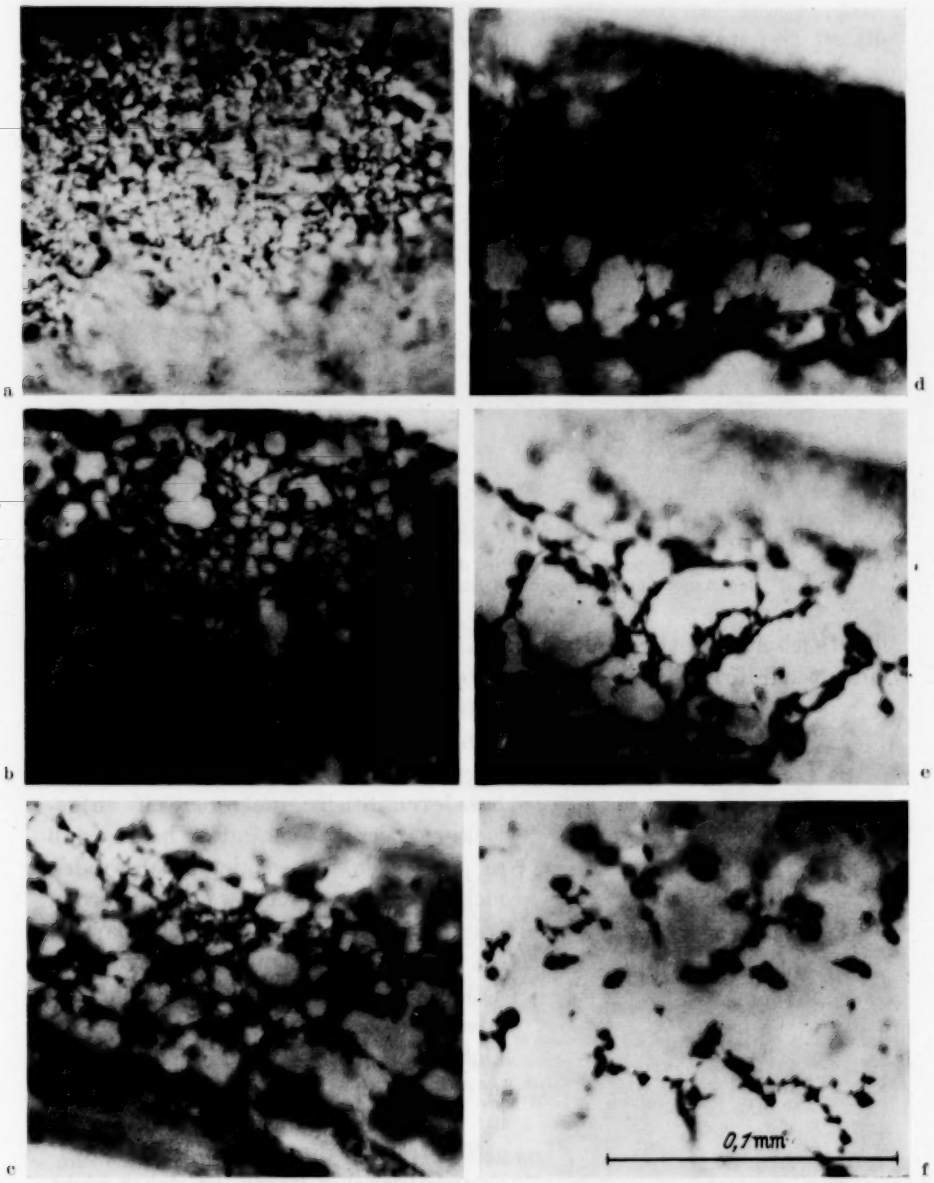


Abb. 3. Struktursubstanzen jodiert. Apikal-basale Abnahme der Texturdichte. a—f etwa 0,1, 0,5, 1, 2, 2,5 und 3 mm unterhalb der Stielspitze

Die metachromatisch färbbare Struktur stellt ein feines dreidimensionales Netzwerk dar (Abb. 2 und 3). Die Dichte der Textur nimmt von apikal nach basal ab. Im allgemeinen war das Netz etwa 2 mm von

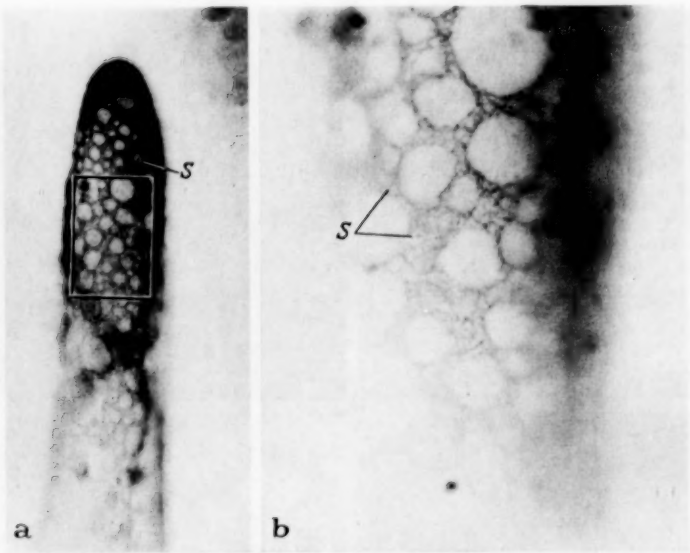


Abb. 4. Abnorme Strukturauflockerung in der Stielspitze (a); b stärkere Vergrößerung des Ausschnittes aus (a). *S* Strukturierung des Protoplasten

der Stielspitze entfernt nur noch in Form von mehr oder weniger vereinzelten Fibrillen vorhanden (Abb. 2c und 3f). Ungefähr 3—4 mm unterhalb der Stielspitze konnten auch Spuren des Netzwerkes nicht mehr angefärbt werden. Ob es sich in den basaleren Stielregionen soweit aufgelockert oder so verändert hatte, daß es mit den verwendeten Methoden nicht mehr nachgewiesen werden konnte, oder ob in diesen Stielpartien ein Abbau der Struktur erfolgt war, ließ sich noch nicht entscheiden. Denn unsere Beobachtungen erfolgten im Lichtmikroskop. Die Möglichkeit, daß in den basalen Stielteilen die Struktur in Form von Mikrofibrillen weitergeführt wird, die unterhalb des Auflösungsbereiches liegen, ist daher nicht auszuschließen. Darüber können vielleicht elektronenmikroskopische Untersuchungen Aufschluß geben.

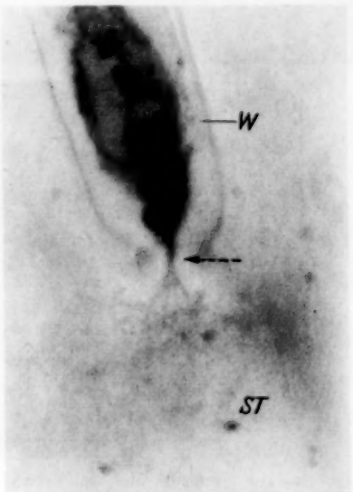


Abb. 5. Verbindung der Stielstruktur (*ST*) mit der Wirtelstruktur (*W*) ----→

Bei manchen Pflanzen war die meist charakteristisch ausgebildete Textur durch größere, ± kreisförmige Zwischenräume durchsetzt (Abb. 4). Es ist jedoch

nicht bekannt, wodurch diese Texturauflockerung bedingt ist. Möglicherweise stellt sie ein Fixierungsartefakt dar. Auf diese Frage werden wir noch im allgemeinen Zusammenhang zu sprechen kommen (s. S. 53).

In Wirtelhaaren wurde ebenfalls eine netzförmige Strukturierung gefunden. Dies gilt aber nur für die jüngeren Wirtel am Stielende,

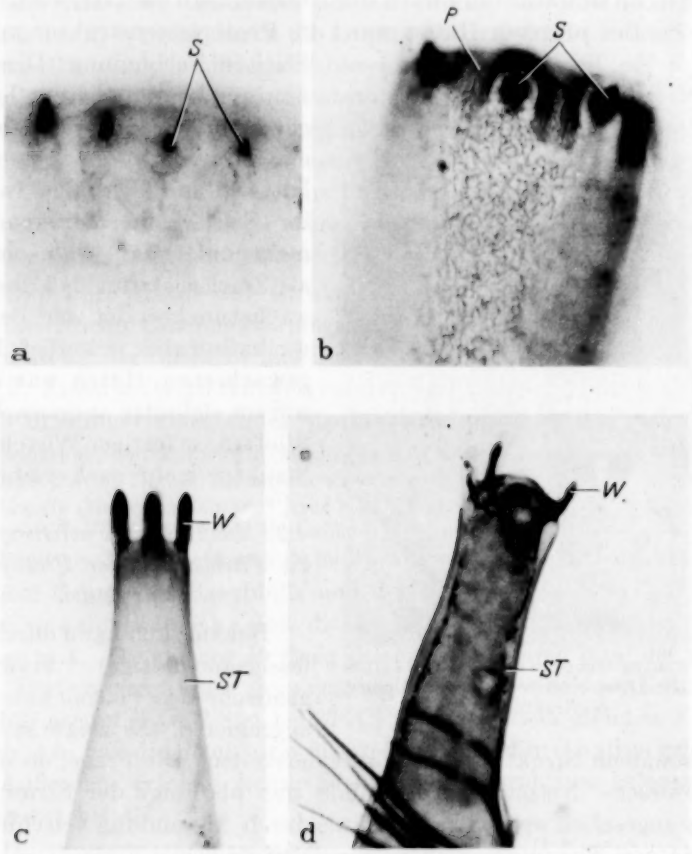


Abb. 6. Entstehung der Wirtelstruktur bei der Wirtelbildung. a Verdichtung der Stielstruktur (*S*); b sichtbare Differenzierung der Wirtel (*S* dichte Strukturierung; *P* Ansammlungen von saurem Polysaccharid); c und d Strukturierungen der Wirtel. Besonders bei d ist der Zusammenhang der Stiel- (*ST*) und Wirtelstruktur (*W*) deutlich erkennbar

nicht dagegen für ältere Wirtel, die an weiter basalwärts gelegenen Stielregionen noch vorhanden waren. Beim Übergang der Stielstruktur zur Wirtelstruktur beobachteten wir öfter ein „Zusammendrehen" des Netzes (Abb. 5 ----→). Die Entstehung der Wirtelstruktur läßt sich aus Abb. 6 ableiten. Zunächst trat an den Stellen, an denen die späteren Wirtel entstehen, eine sehr feine und dichte Strukturierung auf, die im Verlaufe des Wirtelwachstums aufgelockert wurde.

Auch bei der Bildung von Hüten war, noch ehe eine sichtbare Differenzierung erfolgt war, eine Verdichtung der Stielstruktur erkennbar. Wuchsen die Hutkammern aus, so erschien in ihnen ebenfalls eine erst dichte, im Verlaufe des weiteren Wachstums sich auflockernde Strukturierung. Dabei war — analog der Strukturverteilung in den Stielen — an den äußeren Enden der Hutkammern das Netzwerk dichter (Abb. 7). Bei jüngeren Hüten stand die Protoplastenstruktur mit dem Stiel in Verbindung. Diese Verbindung konnte nicht mehr nachgewiesen werden, wenn der Hut einen Durchmesser von etwa 3 mm hatte. Dann allerdings war auch im Stiel keine Strukturierung mehr anfärbbar, wahrscheinlich als Zeichen dafür, daß das Stielwachstum beendet war, das Hutwachstum aber weiterlief. In ausgewachsenen Hüten war ebenso wie im definitiv ausgewachsenen Stiel und in fertigen Wirteln keine Struktur mehr nachweisbar.

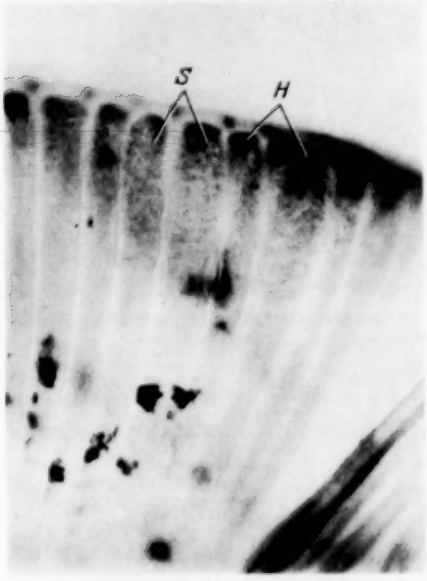


Abb. 7. Strukturierung in den Kammern eines Hutes (*H*); (Hutdurchmesser etwa 3 mm); *S* Struktur

2. Einfluß der Fixierung auf die Färbbarkeit der Protoplastenstruktur

Bekanntlich kann durch *saure* (essigsäurehaltige) Fixierungsgemische das Plasma netzförmig aggregieren. Es zeigte sich, daß so entstandene Strukturen Artefakte darstellen. Die Frage, ob die hier nachgewiesene Netzstruktur ebenfalls nur als Folge der Fixierung in Carnoy angesehen werden kann, wurde durch Anwendung verschiedener, heute in der Elektronenmikroskopie gebräuchlicher Fixierungen näher geprüft. Neben Carnoy verwendeten wir mit N-HCl auf Farbumschlag von Neutralrot als Indicator eingestelltes 30%iges Formol und auf *pH* 7 gepuffertes Osmiumtetroxyd (2%ig). Beide Fixierungsmittel wurden bei +4°C angewendet. Es zeigte sich, daß die Protoplastenstrukturierung auch bei Fixierung in Formol nachweisbar war. Demnach ist die Strukturierung nicht als Folge der *Carnoy*-Fixierung entstanden. Bei Fixierung in gepufferter OsO_4-Lösung war die Struktur nicht nachweisbar. Hierbei konnte jedoch nicht ausgeschlossen werden, daß es die chromotropen Gruppen blockiert oder bereits Proteine so verändert, daß in Trypsin keine Proteolyse stattfinden kann.

3. Cytochemische Charakterisierung der Struktursubstanzen

Um die Frage zu prüfen, welche Substanzen am Aufbau der Protoplastenstruktur beteiligt sind, wurden die folgenden Farb- und cytochemischen Reaktionen durchgeführt.

a) Die Proteine der Stielspitze, die mit Azocarmin B bei *pH* 2 (WERZ 1959) oder mit Fast Green bei *pH* 8,6 (WERZ, unveröff.) dargestellt werden können, werden durch die tryptische Extraktion in kurzer Zeit entfernt. Die danach übriggebliebenen, mit Azur I bei *pH* 8 metachromatisch färbbaren Struktursubstanzen waren dagegen noch nach 8—12stündiger Trypsinbehandlung nachweisbar. Es ist daher sehr unwahrscheinlich, daß die nachgewiesene Netzstruktur aus Protein besteht. Neben der hohen Trypsinresistenz im denaturierten Zustande müßten solche Proteine zudem noch stark saure Gruppen besitzen, wie die metachromatische Färbung zeigte.

b) Die saure Natur der Struktursubstanzen ergab sich besonders durch das starke Bindungsvermögen für Methylenblau bei *pH* 2 und die Erhaltung der metachromatischen Färbung mit Azur I ebenfalls bei *pH* 2. Einen weiteren Hinweis auf das Vorhandensein saurer Gruppen gab das Bindungsvermögen der Struktursubstanzen für Trypaflavin.

Die verschiedenen Farbstoffe wurden in 0,01%iger Lösung angewendet. Die Färbedauer betrug 1 min. Anschließend wurde in dem jeweiligen Lösungsmittel der Farbstoffe (Methylenblau und Azur-I in Citrat-HCl-Püffer *pH* 2; Trypaflavin in Wasser) differenziert bis keine Farbwolken mehr abgingen. Die typische Fluorescenz gebundenen Trypaflavins wurde im Fluorescenzmikroskop beobachtet.

c) Auf Grund der Basophilie und der Metachromasie bei *pH* 2 war es sehr unwahrscheinlich, daß die Struktur aus Ribosenucleinsäuren aufgebaut ist. Die nähere Prüfung dieser Frage durch eine der tryptischen Proteinextraktion vorangegangenen Ribonuclease-Extraktion (1 mg RN-ase/ml H_2O; 2 Std bei 37° C) führte zu dem gleichen Schluß: es ergab sich, daß die Strukturierung des Protoplasten erhalten geblieben war. Außerdem erfolgte keine Färbung der Struktursubstanzen mit Pyronin bei *pH* 4,7.

d) Durch die metachromatische Reaktion bei *pH* 2 wird polymeres Kohlenhydrat mit sauren Gruppen *(—PO_3H_2; —SO_3H; —COOH)* angezeigt. Hierfür gab die Färbbarkeit der Protoplastenstruktur mit Alcian blue einen weiteren Hinweis. Der positive Ausfall der Schiff-Reaktion nach Perjodsäureoxydation bestätigte die Anwesenheit von Polysaccharid.

Alcian blue (LIGHT) wurde in 2%iger, frisch filtrierter, wäßriger Lösung angewendet (STEEDMAN 1950). Es wurde genau 1 min gefärbt und danach in Wasser differenziert. Die Perjodsäure-Schiff-Reaktion wurde nach der von HOTCHKISS (1948) angegebenen Methode durchgeführt.

e) Läßt man die Pufferlösung (*pH* 8), in der die Versuchsteile beobachtet wurden, langsam eindunsten, so können aus dem Netzwerk

Formen entstehen, wie sie in Abb. 8 dargestellt sind. Es handelt sich dabei um letztlich schraubenförmige Aggregationen, die aus aneinandergelagerten Einzelfibrillen bestehen und wahrscheinlich einen bestimmten Hydratationszustand besitzen. Pectinähnliche Stoffe (Polyuronide) zeigen teilweise ein ähnliches Verhalten.

Nach allen diesen Befunden ist es sehr wahrscheinlich, daß die Protoplastenstruktur, die nach der tryptischen Proteinextraktion mit Azur-I

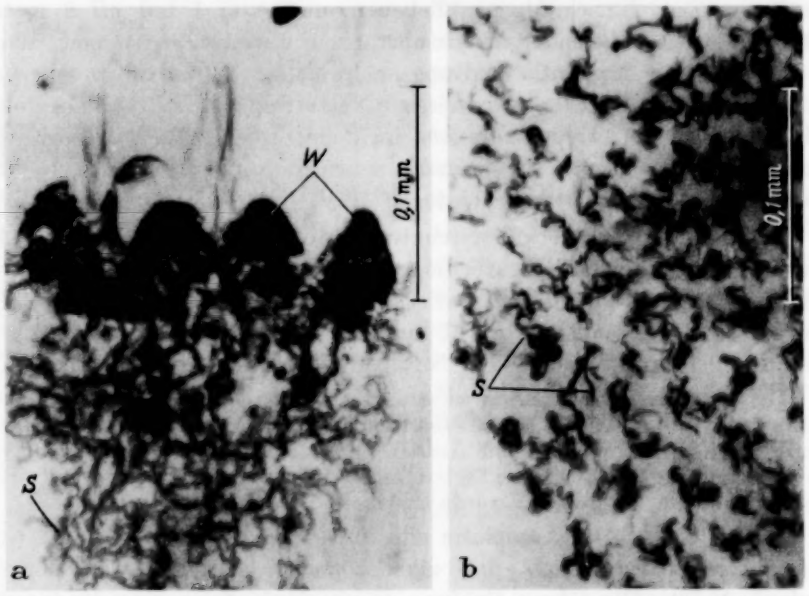


Abb. 8 a—d. Auflösung des Netzwerkes beim Eintrocknen in schraubenförmige Einzelaggregationen (*S*); *W* Wirtelanlagen. a Bildung von schraubigen Aggregationen in Wirtelanlagen und am Stielende; b in der darauffolgenden Stielregion;

metachromatisch gefärbt dargestellt werden kann, im wesentlichen aus saurem Polysaccharid besteht. Da die anionische Natur der Strukturpolysaccharide erst nach Proteolyse erkennbar wird, kann angenommen werden, daß ein Proteinanteil die sauren Gruppen des Polysaccharids normalerweise „maskiert". Es ist nicht ausgeschlossen, daß z. B. die mit Azocarmin-B oder mit Fast Green anfärbbaren basischen Proteine Partnerproteine der Strukturpolysaccharide sind.

4. Bildung der Protoplastenstruktur

Wie wir sahen, war in den basalen Stielregionen der Acetabularienzelle eine spezielle Strukturierung des Protoplasten nicht mehr nachweisbar. Daher untersuchten wir, ob in diesen Stielregionen eine Neubildung der Struktur stattfinden kann und welche Bedingungen dafür erfüllt sein müssen.

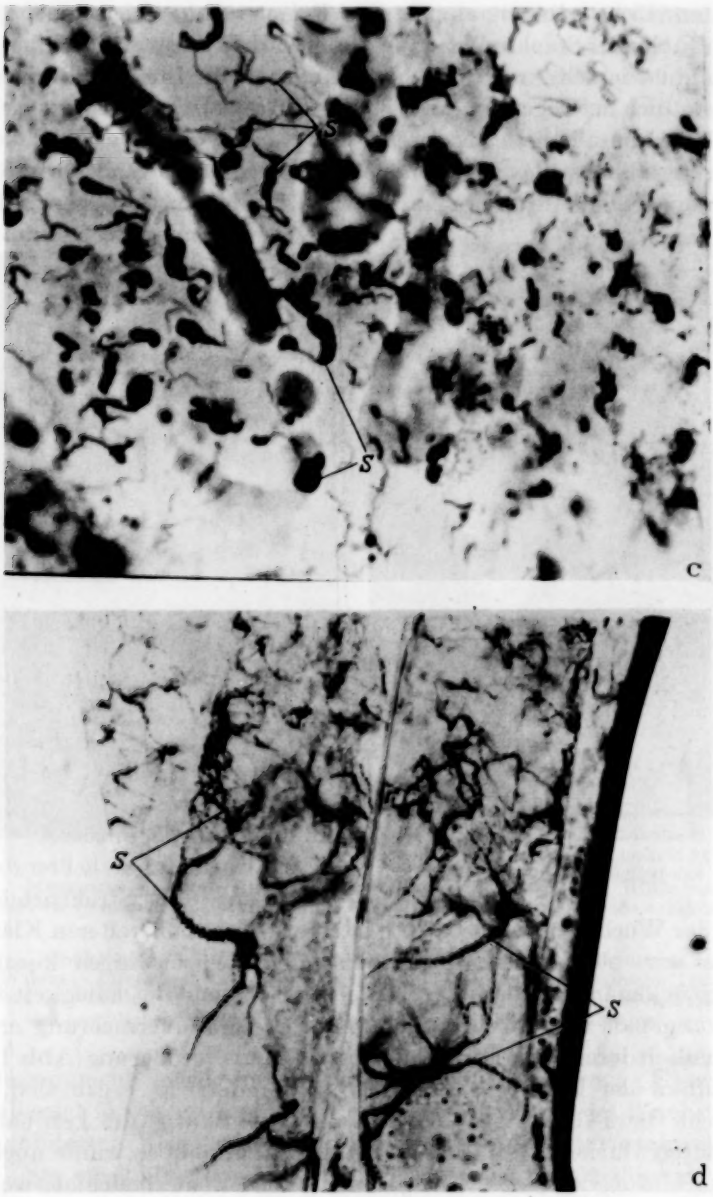


Abb. 8c u. d. c Bildung von Schraubenaggregationen und Übergang zur Spiralstruktur; d Spiralstrukturen in Wirteln am apikalen Stielende

a) Bei der Untersuchung kernhaltiger Hinterstücke, die zunächst keine Strukturierung des Protoplasten zeigten, ergab sich, daß unter

normalen Lichtbedingungen mit der Regeneration einer neuen Stielspitze auch die Struktur nachweisbar wurde. Ihre Ausbildung fand jedoch nicht in dem ursprünglich vorhandenen Stielstück statt, sondern ausschließlich im Regenerat, also in der Stielregion, in der hauptsächlich das Wachstum lokalisiert ist.

Bei der Bildung des Regenerates konnten an seiner äußersten Spitze zunächst ebenfalls stark metachromatisch färbbare Substanzen in Form kleiner „Grana" beobachtet werden (Abb. 9). Diese Grana konnten auch nachgewiesen werden, ehe eine Strukturverdichtung bei der Wirtel- oder Hutbildung erfolgt war. Ein Übergang von den Grana zur danach zu beobachtenden Netzstruktur war nicht zu erkennen. Es ist jedoch möglich, daß die ungeordneten Grana unter der Wirkung von speziellen, richtenden Faktoren zu der feinen Textur der Struktur zusammengelagert werden, oder als Haftpunkte der Struktur an der in der Zellmembran fungieren.

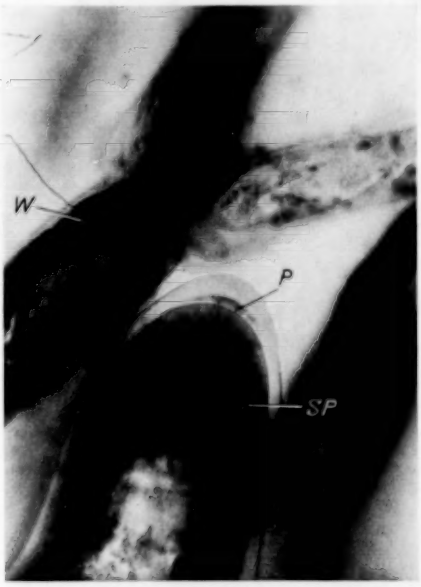


Abb. 9. Nachweis von „nichtstrukturiertem" saurem Polysaccharid (*P*) in der äußersten Stielspitze (*SP*); *W* Wirtel

Bei Teilen, die aus unbekannten Gründen nicht wuchsfähig waren, wurde eine Strukturbildung nicht beobachtet.

b) Die Befunde ließen darauf schließen, daß Strukturbildung nur in der Wuchszone wachsender Systeme erfolgt. Zur weiteren Klärung prüften wir, ob in den normalerweise nicht wuchsfähigen kernlosen Hinterstücken im Licht — diese Teile besitzen wohl die Fähigkeit ihren Membrangehalt zu vermehren, aber diese Membranvermehrung erfolgt vornehmlich durch Apposition ohne Oberflächenvergrößerung (Abb. 10) — ein Aufbau der Protoplastenstruktur stattfindet. Es ergab sich, daß das nicht der Fall war. Wurde weiterhin das Wachstum kernhaltiger Teile durch Dunkelstellen sistiert (STICH 1953, 1956), so wurde auch die Strukturbildung sistiert. Wurden solche Teile wiederbelichtet, wonach sie weiterwuchsen, so wurde in der wachsenden Stielspitze sogleich neue Struktur nachweisbar.

c) Es scheint danach, daß die Protoplastenstruktur nur in wachsenden Teilen und nur beim Ablauf der Photosyntheseprozesse entstehen kann. Um diese Frage noch näher zu prüfen, untersuchten wir die Struktur-

bildung bei an sich nicht wuchsfähigen Hinterstücken, in denen aber unter der Wirkung des Zellkernes *in Dunkelheit* ein starkes Wuchsvermögen induziert worden war (J. und Ch. Hämmerling 1959a, b). Hierfür wurden kernhaltige Hinterstücke sofort nach der Amputation ins Dunkle gebracht, wobei ihr Wachstum unterdrückt und keine Struktur ausgebildet wurde (s. oben). Nach verschieden langen Verdunkelungszeiten wurde diesen Teilen das kernhaltige Rhizoid amputiert

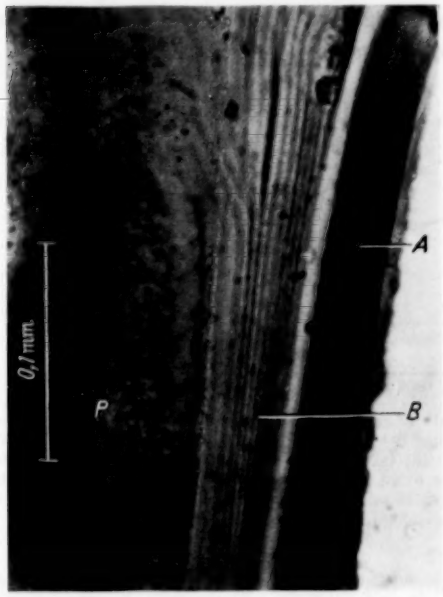


Abb. 10

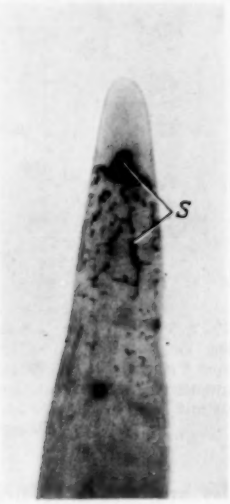


Abb. 11

Abb. 10. Membranwachstum ohne Flächenwachstum bei kernlosen Hinterstücken. *A* ursprünglich vorhandene Zellwand; *B* auf die vorhandene Zellwand innen aufgelagerte neue Zellwand; *P* Protoplast

Abb. 11. „Unvollständige" Strukturbildung in einem Regenerat eines kernlosen Hinterstückes, in dem in Dunkelheit unter der Wirkung des Zellkernes Wuchsvermögen induziert worden war. *S* Struktur. (Amputation des Zellkernes nach 14 Tagen Dunkelheit, Fixierung der anschließend wiederbelichteten kernlosen Teile 10 Tage später)

und die nunmehr kernlosen Hinterstücke wiederbelichtet. Es zeigte sich, daß auch in solchen Teilen erst nach dem Einsetzen des Wachstums in den gebildeten Regeneraten und nur in dieser Struktur nachweisbar wurde. Sie erreichte aber bei weitem nicht die Regelmäßigkeit und Ausbreitung wie in den ständig kernhaltig gebliebenen Teilen. Sie war zwar auch an der apikalen Stielspitze dichter gepackt, aber der Übergang zu isolierten Fibrillen war wesentlich kürzer (Abb. 11).

Aus allen diesen Versuchen ergibt sich somit: überall dort und nur dort, wo Spitzenwachstum stattfindet, wird die Struktur gebildet. Die

Photosynthese allein genügt nicht zu ihrer Entstehung; denn Teile, die photosynthetisieren, aber nicht wachsen (kernlose Hinterstücke), bilden keine Struktur aus. *Die Strukturbildung darf demnach als mikroskopisch erkennbarer Teil des Wuchsprozesses aufgefaßt werden.* An der Basis jedes Wuchsprozesses stehen die „morphogenetischen Substanzen", die ihn induzieren (HÄMMERLING 1934a, b, 1936, 1953, 1957; HÄMMERLING u. Mitarb. 1958; J. und CH. HÄMMERLING 1959a, b). Am Ende des Wuchsprozesses steht das makroskopisch sichtbare fertige Gebilde. Die cytoplasmatische Strukturbildung liegt zwischen Anfang und Ende dieser Vorgänge, dem Anfang sehr genähert.

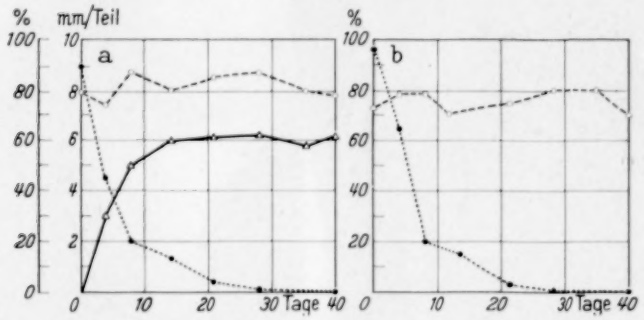


Abb. 12. a Vergleich der Längenzunahme (△——△) bei kernlosen Vorderstücken im Licht mit dem Verhalten ihrer Strukturierung (○----○) und ihrem Gehalt an Azocarmin-B-positivem Protein (●·····●); *N* jeweils 25; b Vergleich des Verhaltens der Protoplastenstrukturierung bei kernhaltigen, bereits etwa 10 mm regenerierten Zellen in Dunkelheit (○----○) mit ihrem Gehalt an Azocarmin-B-positivem Protein (●·····●); *N* jeweils 25. Die kernhaltigen Zellen wuchsen in Dunkelheit nicht weiter

Das aus einem Wuchsvorgang hervorgegangene Gebilde kann entweder ein Stiel oder ein Wirtel oder ein Hut sein. Bisher besteht jedoch kein Grund zu der Annahme, daß die gebildete Struktur auch etwas mit der *Determination* zu einer dieser Differenzierungen zu tun hat. Denn sie wird, soweit die lichtmikroskopischen Beobachtungen einen Schluß zulassen, in allen 3 Fällen in mehr oder weniger gleicher Form ausgebildet.

5. Erhaltungsfähigkeit einmal gebildeter Protoplastenstruktur

Die Strukturbildung erwies sich als abhängig von der Wirkung „morphogenetischer Substanzen" beim Ablauf der Photosyntheseprozesse. Es war nun die Frage, wie sich bereits gebildete Struktur verhält, wenn in den normalen Ablauf des Wachstums experimentell eingegriffen wird. Hierfür untersuchten wir kernlose, belichtete Vorderstücke nach Beendigung ihres Wachstums — es wurde etwa nach 2 Wochen eingestellt — sowie kernhaltige Hinterstücke, die im Licht bereits etwa 10 mm Stiel regeneriert hatten, danach aber durch

Verdunkelung einem Wuchsstop unterworfen wurden. Bei beiden Systemen war also anfänglich die Strukturierung des Protoplasten in ihrer charakteristischen Ausprägung vorhanden. Es zeigte sich, daß die Struktur in beiden Systemen bis zu 30 Tagen erhalten blieb, also äußerst stabil war (Abb. 12).

Das Vorhandensein der Protoplastenstruktur bedingt also noch kein Wachstum, ein Umstand, der mit der eben erörterten Auffassung in

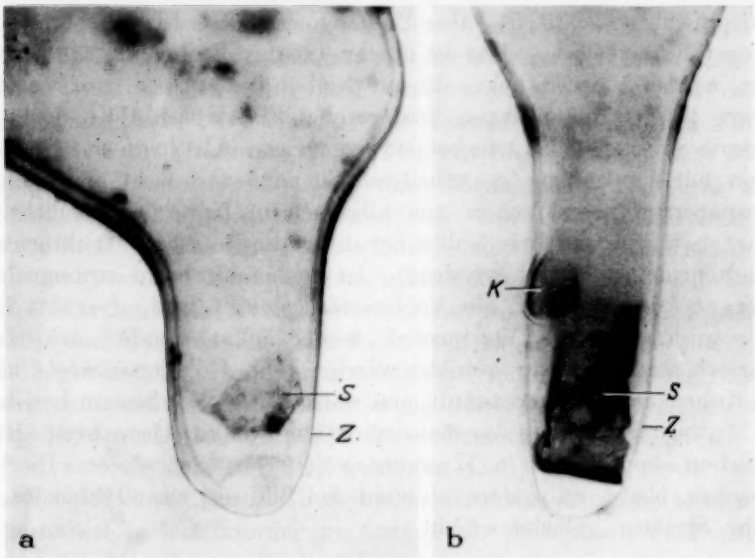


Abb. 13. Strukturbildung in Heteromorphosen von Vorderstücken, die vorne nicht regenerierten. a Regeneration etwa 0,1 mm. b Regeneration etwa 0,2 mm. *S* Struktur; *Z* Zellwand; *K* verkümmerte Wirtel- oder Hutanlage

Einklang steht, daß die Struktur keine induktive Wirkung auf das Wachstum besitzt. Weiterhin zeigen die Befunde, daß sich die Struktur ganz anders verhält als das ebenfalls beim Spitzenwachstum nachgewiesene basische Protein (Werz 1959 und unveröff.). Dieses wird unter den gleichen Bedingungen sehr schnell und stark abgebaut (Abb. 12).

In fertig ausgewachsenen Stielpartien ist keine Struktur mehr nachweisbar (s. Abs. 1). Wenn sie unter den hier geschilderten Bedingungen nach „Beendigung" des Wachstums noch so lange erhalten bleibt, so ist das kein Widerspruch zum Verhalten fertig ausgewachsener Stielregionen. Denn sowohl bei den kernhaltigen, verdunkelten Teilen wie bei den kernlosen Teilen bleibt das Wachstum vor seinem normalen Ende stehen, wie daraus hervorgeht, daß es bei den kernhaltigen Teilen nach Wiederbelichtung, bei den kernlosen Teilen nach Implantation

eines Kernes sogleich wieder aufgenommen wird (HÄMMERLING 1955). Ebenso bleibt, wie hinzugefügt sei, einmal gebildete Struktur erhalten, wenn das Stielwachstum eines belichteten kernhaltigen Teilstückes aus unbekannten Gründen sistiert wurde.

6. Strukturbildung bei Entstehung von Heteromorphosen

Wenn die Entstehung der gefundenen Struktur Teil des Wuchsprozesses selbst ist, so sollte sie auch dann gebildet werden, wenn eine Heteromorphose entsteht, also Bildung eines Vorderendes aus einer hinteren Schnittfläche. Das ist in der Tat der Fall (Abb. 13). Untersucht wurden Vorderstücke, die nur hinten auswuchsen, während das weitere Wachstum an ihren Vorderenden stehenblieb. Die dort vorhandene Struktur blieb wie bei den im vorigen Abschnitt dargestellten Teilen mit Wachstumsstop erhalten. Sie wird also nicht nach hinten abtransportiert (was schon aus allgemeinen Erwägungen nicht zu erwarten war; denn wie sollte Struktur durch einen strukturfreien Zwischenraum verlagert werden?). In den bisher nicht untersuchten Fällen, bei denen hinten ein Vorderende gebildet wird, aber das Teilstück auch vorne als Vorderstück weiterwächst, würde auch vorne natürlich neue Struktur gebildet werden. Die Polaritäts*umkehr* kann man daher zunächst nur auf die neu entstehende Wuchszone beziehen. Das Mutterstück könnte durchaus seine alte Polarität bewahren. Hierauf haben schon J. und CH. HÄMMERLING (1959b) hingewiesen. Hiervon abgesehen, bleibt zu prüfen, ob nicht bei Bildung eines Rhizoides die gleiche Struktur gebildet würde.

Diskussion

1. Die bei *Acetabularia mediterranea* erhaltenen Strukturbilder erinnern — größenmäßig natürlich nicht vergleichbar — an die elektronenmikroskopischen Bilder, die an Zellwandstellen mit Flächenwachstum bei anderen Pflanzen erhalten wurden (z. B. FREY-WISSLING 1951, 1959; HOUWINK und ROELOFSEN 1954; PRESTON 1959). In diesen Fällen wurde aber die Strukturierung der Zellwände dargestellt, während es sich bei den hier beschriebenen Strukturen um eine Oberflächenstrukturierung des Protoplasten handelt.

Größenmäßig vergleichbar zeigt die Acetabularienstruktur Ähnlichkeiten mit den von MONNÉ (1946, 1948) beschriebenen chromidientragenden Fibrillen. Diese sind RNS-haltig und Teil der fibrillären Struktur des Grundcytoplasmas (LEHMANN und BISS 1949). Nach CLAUDE und FULLAM (1946) ist es möglich, daß RNS-haltige Mikrosomen in diese fibrillären Strukturen eingelagert sind. Nach unseren Versuchen war in der Acetabularienstruktur keine RNS nachweisbar. Diese besteht vielmehr aus saurem Polysaccharid. Das schließt natürlich

nicht aus, daß in die Struktur eingelagert — ähnlich den Monnéschen Chromidien — RNS-haltige Partikel doch vorhanden waren, die aber auf Grund der Behandlung bei *pH* 8 und 37° C herausgelöst wurden. Mit dieser Möglichkeit, die aber mit den derzeitigen Methoden nicht geprüft werden kann, ist zu rechnen, zumal nach vorläufigen Versuchen festgestellt wurde, daß nach Fraktionierung der Zellelemente und anschließender Fixierung in Carnoy lediglich die „Mikrosomenfraktion" netzförmige Aggregationen zeigte.

2. Eine bereits eingangs gestellte Frage ist, ob die Strukturierung des Protoplasten der Acetabularienzelle ein Fixierungsartefakt darstellt. Es ist bekannt, daß Fixierung von Plasmaproteinen je nach angewendeter Fixierungsmethode zur Bildung von verschiedenen Mustern führen kann (z. B. Frey-Wissling 1955). Dies gilt besonders für saure Fixierungsgemische, wie es die Carnoysche Lösung darstellt. Aber auch Formolfixierung kann durch Vernetzung von Polypeptidketten, besonders auch von Pektinen (Deuel 1947) zu Musterbildungen führen. An Leukocyten und Blutplättchen untersuchten Hagenau und Bernhard (1952) den Einfluß verschiedener Fixierungsmittel auf die Fibrillenstruktur des Hyaloplasmas. Dabei stellten sie fest, daß — obwohl je nach angewendeter Fixierungsmethode verfeinerte oder vergröberte Muster entstanden — die Orientierung der Fibrillen immer dieselbe blieb. Entsprechendes gilt auch für die Acetabularienstruktur. Abgesehen von der Wirkung des neutralen OsO_4 (s. Abs. 2), die wahrscheinlich die chromotropen Gruppen der Strukturensubstanzen blockierte, blieb sowohl nach Fixierung in Carnoy als auch nach Fixierung in Formol das Muster und die Anordnung der Struktur in den Zellen erhalten. Wenn von der natürlich vergröbernden Wirkung der Fixierungsprozesse abgesehen wird, kann man mit großer Wahrscheinlichkeit annehmen, daß die Strukturensubstanzen auch *in vivo* zumindest die Anordnung in der Zelle besaßen, die nach der Fixierung gefunden wurde.

Es ist indessen für die Frage nach polaren Strukturunterschieden in der Acetabularienzelle nicht entscheidend, ob diese Strukturen in genau der Form, in der wir sie anfärben konnten, auch in der lebenden Zelle vorhanden sind. Unsere Befunde zeigen, daß im Protoplasten der *Acetabularia*-Zellen polare Strukturunterschiede bestehen, was sich daraus ergibt, daß in den apikalen Stielregionen eine andere Strukturierung der sauren Polysaccharide erscheint als in den basalwärts gerichteten Stielregionen.

3. Auf Grund sehr verschiedenartiger Befunde hatte sich eine enge Beziehung zwischen nachweisbarer Struktur des Protoplasten und dem Wachstum einer Zelle ergeben: nur in wachsenden Zellen wird die Struktur gebildet. Eine Induktion des Wuchsprozesses erfolgt durch die Struktur aber nicht. Denn wie die Befunde an kernlosen

Vorderstücken oder an kernhaltigen verdunkelten Pflanzen zeigten (s. Abs. 5), war das Wachstum dieser Teile eingestellt worden, obwohl ihre Struktur noch vorhanden war. Das gleiche gilt, wenn an belichteten kernhaltigen Teilen das Wachstum aus unbekannten Gründen vorzeitig eingestellt wurde. Damit aber verhält sich die Protoplastenstruktur gänzlich verschieden von den in der Stielspitze angereicherten basischen Proteinen oder der ebenfalls hier angereicherten hochpolymeren RNS. Auch diese Substanzen wurden nur in wachsenden Zellen gebildet, nahmen aber in kernlosen Teilen mit der Verringerung der Wuchsrate oder verdunkelten, nicht mehr wachsenden Zellen stark ab (WERZ 1959, 1960).

4. In Dunkelheit, während der das Wachstum einer Zelle sistiert wird, wird Strukturpolysaccharid nicht gebildet. Zumindest als ein Grund hierfür dürfte das Fehlen der Photosyntheseprozesse anzusehen sein. Über die Synthese der sauren Polysaccharide, die die Struktur aufbauen, wissen wir jedoch noch nichts. Zur Zeit läßt sich auf Grund spezieller cytochemischer Befunde nur sagen, daß am Orte der Strukturpolysaccharidsynthese auch eine starke Anreicherung von basischen Proteinen (WERZ 1959 und unveröff.) und von RNS nachgewiesen werden kann. Möglicherweise sind auch bei *Acetabularia* (Uridin-)Nucleotid enthaltende Hexosen (z. B. *UDP*-Glucuronsäure oder ähnliches) beteiligt, wie es für die Bildung von saurem Polysaccharid bei anderen Objekten (z. B. Staphylokokken, Hefen) bekannt ist (PARK 1952; CABIB et al. 1953).

5. Das Wachstum der Acetabularienzelle ist wie bei anderen pflanzlichen Objekten mit einer Vermehrung der Zellmembran durch Flächenwachstum verbunden. Im Gegensatz zu den nicht wachsenden kernlosen Hinterstücken, bei denen appositionelle Anlagerung der Membran erfolgt (Abb. 9), wird die Zellmembran der wachsenden Teile vornehmlich durch intussuszeptionelle Anlagerung an der Stielspitze gebildet (WERZ 1957). An dieser Stelle, an der das Flächenwachstum am stärksten ist, erscheint die Textur der Protoplastenstruktur sehr dicht. In den basaleren Stielregionen ist das Flächenwachstum abgeschlossen. Hier war die Struktur sehr stark aufgelockert oder nicht mehr nachweisbar. Es lag daher nahe, die Dichte der Textur mit der Stärke des Flächenwachstums in Verbindung zu setzen. Nach FREY-WISSLING (z. B. 1959) wird Flächenwachstum in einer „membranogenen Oberflächenschicht des Cytoplasmas" verursacht. Dies erfolgt in der Weise, daß in dieser Schicht des Protoplasten Hemizellulosen und Pektinstoffe der Matrix — der Hauptmasse der Primärwand — synthetisiert werden und „Zellulose-Elementarfibrillen zur Kristallisation" gebracht werden. Es wäre nach den erhaltenen Befunden denkbar, daß bei *Acetabularia* diese membranogene Zone in der Stielspitze lokalisiert ist, an der Stelle also, an der die Textur der Struktur äußerst dicht ist. Durch Einlagerung von Membranbausteinen würde dann die Struktur immer

stärker „verdünnt" werden, was schließlich dazu führen würde, daß die Membran nach basal immer dicker wird und die Struktur nicht mehr nachgewiesen werden kann. Weitere Versuche werden zeigen müssen, ob Vermutungen dieser Art das Richtige treffen.

Summary

On the surface of the apical protoplast of growing cells of *Acetabularia mediterranea* structured fibrils are stained with the basic dye azure-I after digestion of protein with trypsin.

The structured fibrils are very probably composed of anionic polysaccharides, may be of the polyuronide type. Normally these polysaccharides are masked by unknown protein.

The synthesis of the structured substances in the stalk tip is strongly related to the action of active "morphogenetic substances" under light conditions.

In normal growing cells the density of the structure is polarly distributed. In the stalk tip the texture is close. In more basal stalk-regions it becomes widened and in stalk-regions about 3—4 mm below the stalk tip no structure can be demonstrated.

The protoplast structure seems to be related to growth processes concerning surface growth. Growth, however, is not induced by the structure, as shown at enucleate anterior cell parts or darkened cells.

Literatur

Beth, K.: Experimentelle Untersuchungen über die Wirkungen des Lichtes auf die Formbildung von kernhaltigen und kernlosen *Acetabularia*-Zellen. Z. Naturforsch. 8b, 334 (1953). — Claude, A., and E. F. Fullam: The preparation of sections of Guinea pig liver for electron microscopy. J. exp. Med. **83**, 499 (1946). — Cabib, E., L. F. Leloir and C. E. Cardini: J. biol. Chem. **203**, 1055 (1953). Aus R. H. Smith, The biosynthesis of some connective tissue components. In: Progress in biophysics and biophysical chemistry, vol. 8. p. 218: Pergamon-Press 1957. — Deuel, H.: Über die Einwirkung von Formaldehyd auf Pektinstoffe. Helv. chim. Acta **30**, 1269 (1947). — Frey-Wissling, A.: Über verbänderte Cellulosemikrofibrillen in Zellwänden. Holz als Roh- u. Werkstoff **9**, 333 (1951). — Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. Protoplasmatologia II. Wien: Springer 1955. — Die pflanzliche Zellwand. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959. — Hämmerling, J.: Über formbildende Substanzen bei *Acetabularia mediterranea*, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **131**, 1 (1934a). — Über Genomwirkungen und Formbildungsfähigkeit bei *Acetabularia*. Wilhelm Roux' Arch. Entwickl.-Mech. Org. **132**, 424 (1934b). — Studien zum Polaritätsproblem. Zool. Jb. **56**, 441 (1936). — Zur Lebensweise, Fortpflanzung und Entwicklung verschiedener Dasycladaceen. Arch. Protistenk. **97**, 7 (1944). — Nucleo-cytoplasmic relationship in the development of *Acetabularia*. Int. Rev. Cytol. **2**, 475 (1953). — Neuere Versuche über Polarität und Differenzierung bei *Acetabularia*. Biol. Zbl. **74**, 545 (1955). — Nucleus and cytoplasm in *Acetabularia*. 8. Congr. Intern. de Botan., Paris. Compt. rend. des Séances et Rapp. et Communic. déposés

lors du Congr. dans la Sect. **10**, 87 (1957). — HÄMMERLING, J. u. CH.: Kernaktivität bei aufgehobener Photosynthese. Planta (Berl.) **52**, 516 (1959a). — Über Bildung und Ausgleich des Polaritätsgefälles bei *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 522 (1959b). — HÄMMERLING, J., H. CLAUSS, K. KECK, G. RICHTER and G. WERZ: Growth and protein synthesis in nucleated and enucleated cells. Exp. Cell Res., Suppl. **6**, 210 (1958). — HOTCHKISS, R. D.: Arch. Biochem. **16**, 131 (1948). Aus L. LISON, Histochimie et Cytochimie animales. Paris: Gauthier-Villard 1953. — HOUWINK, A. L., and P. A. ROELOFSEN: Fibrillar architecture of growing plant cell walls. Acta bot. neerl. **3**, 387 (1954). — LEHMANN, F. E., u. R. BISS: Elektronenoptische Untersuchungen an Plasmastrukturen des *Tubifex*-Eies. Rev. suisse Zool. **56**, 264 (1949). — MONNE, L.: Struktur- und Funktionszusammenhang des Zytoplasmas. Experientia (Basel) **2**, 153 (1946). — Functioning of the cytoplasm. Advanc. Enzymol. **8**, 1 (1948). — PARK, J. T.: J. biol. Chem. **194**, 885, 897 (1952). Aus R. H. SMITH, The biosynthesis of some connective tissue components. In: Progress in biophysics and biophysical chemistry, vol. 8. p. 218: Pergamon-Press 1957. — PRESTON, R. D.: Wall organisation in plant cells. Int. Rev. Cytol. **8**, 33 (1959). — STEEDMAN, H. F.: Quart. J. micr. Sci. **91**, 477 (1950). Aus A. G. E. PEARSE, Histochemistry. Boston: Little, Brown & Co. 1954. — STICH, H.: Der Nachweis und das Verhalten von Metaphosphaten in normalen, verdunkelten und trypaflavinbehandelten Acetabularien. Z. Naturforsch. **8b**, 36 (1953). — Änderungen von Kern und Polyphosphaten in Abhängigkeit von dem Energiegehalt des Cytoplasmas bei *Acetabularia*. Chromosoma (Berl.) **7**, 693 (1956). — WERZ, G.: Membranbildung bei kernlosen wachsenden und nicht wachsenden Teilen von *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. **12b**, 739 (1957). — Über polare Plasmaunterschiede bei *Acetabularia*. Planta (Berl.) **53**, 502 (1959). — Anreicherung von Ribonucleinsäure in der Wuchszone von *Acetabularia mediterranea*. Planta (Berl.) **55**, 22—37 (1960).

Dr. G. WERZ,
Max Planck-Institut für Meeresbiologie, Abt. Hämmerling,
Wilhelmshaven, Anton Dohrn-Weg

Planta 55, 57—66 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

DER EINFLUSS HELLROTER UND DUNKELROTER STRAHLUNG AUF DIE GEOTROPISCHE REAKTION DER KEIMLINGE VON *SINAPIS ALBA* L.

Von

H. Mohr und I. Pichler

Mit 4 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. März 1960)

1. Einleitung

Die Morphogenese (einschließlich Anthocyanbildung) der Keimpflanzen von *Sinapis alba* wird durch Licht gesteuert („Photomorphogenese"). Wir haben bisher folgende lichtabhängigen Reaktionen dieser Keimpflanzen genauer untersucht: Hemmung des Hypokotyl-Längenwachstums, Synthese von Anthocyan in Keimblättern und Hypokotyl, Bildung von Haaren aus Epidermiszellen des Hypokotyls, Förderung des Keimblattwachstums (Mohr 1957, 1959a, b). Dabei haben wir festgestellt, daß alle diese „Photomorphosen" in derselben Weise von den Bestrahlungsverhältnissen abhängen und wir kamen zu dem Schluß, daß diese verschiedenen Photomorphosen nur Manifestationen ein und derselben, durch Licht bewirkten, „fundamentalen Umsteuerung" im Stoffwechsel des Keimlings darstellen. Die auch qualitativ gänzlich verschiedenartige Reaktion der einzelnen Organe bzw. Gewebe als Folge ein und derselben „fundamentalen Umsteuerung" hängt offenbar mit dem „spezifischen Differenziertsein der Zellen" zusammen, die die verschiedenen Organe des Keimlings aufbauen.

Unsere experimentellen Befunde haben uns zu der Vorstellung veranlaßt, daß bei *Sinapis alba* zwei photochemische Reaktionssysteme dieser „fundamentalen Umsteuerung" des Stoffwechsels zugrunde liegen: das bekannte Reversible Hellrot-Dunkelrot-Reaktionssystem („Niederenergiereaktion" = NER) und das sog. Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem („Hochenergiereaktion" = HER) (vgl. hierzu Mohr 1960). Die kombinierte Wirkung dieser beiden photochemischen Systeme ist z. B. auch von Siegelman und Hendricks (1957) festgestellt worden (Anthocyanbildung bei Rotkohlkeimlingen). Während das Reversible Hellrot-Dunkelrot-Pigmentsystem inzwischen physikalisch-chemisch gefaßt werden konnte (Butler u. Mitarb. 1959), hat man über das Blau-Dunkelrot-Reaktionssystem bislang keine direkte Information. Unseren vorläufigen Vorstellungen (vgl. Mohr 1959b) stehen in gewisser Weise die interessanten und umfassenden Vorstellungen von Hendricks und Borthwick (1959a, b) gegenüber, die den theoretischen Beweis zu liefern suchen, daß der an der HER beteiligte Photosensibilisator das Reversible Hellrot-Dunkelrot-Pigmentsystem im dynamischen Gleichgewichtszustand ist. Ein Teil der Anregungsenergie des P_{HR} bzw. des P_{DR} würde nicht für die Umwandlung

verwendet, sondern stünde für die Auslösung der sensibilisierten photochemischen Reaktion im Rahmen der HER zur Verfügung.

Wir wollen in der vorliegenden Arbeit zu der Theorie der HER nicht Stellung nehmen. Dies muß einer folgenden Arbeit, die hierzu neue experimentelle Daten bringen wird, vorbehalten bleiben.

In der vorliegenden Publikation, die die Reihe unserer Arbeiten zur Photomorphogenese der Dikotylenkeimlinge fortsetzt, soll lediglich gezeigt werden, daß auch eine weitere, merkwürdige lichtabhängige

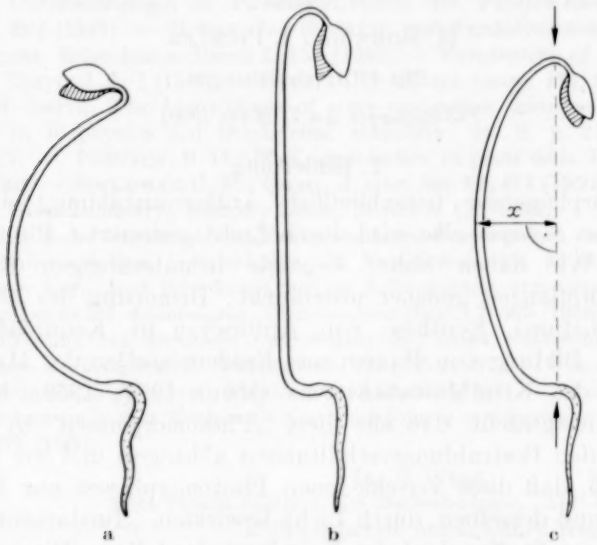


Abb. 1a—c. Schematische Darstellung repräsentativer Dunkel- bzw. Lichtkeimlinge (etwa 72 Std nach Aussaat, 25° C). a Dunkelkeimling; b Keimling, der 24 und 48 Std nach der Aussaat einige Zeit mit Hellrot belichtet wurde. c Die Vorgänge bei der Bestimmung von x. Die Pfeile bezeichnen die Stellen der Schnittführung (vgl. Text)

Reaktion der Keimlinge von *Sinapis alba* in derselben Weise von den Bestrahlungsverhältnissen abhängt wie die bereits untersuchten Photomorphosen.

2. Die untersuchte Reaktion

Wenn die Keimlinge von *Sinapis alba* unter den von uns verwendeten Standardbedingungen auf horizontal liegendem Keimpapier (s. Methodik) im Dunkeln heranwachsen, sind die Hypokotyle meist weit bogenförmig gekrümmt (Abb. 1a). Werden jedoch die frühen Keimlingsstadien auch nur relativ kurz belichtet, so erfolgt eine schnelle Aufkrümmung des Hypokotyls in die Vertikale nahe am Wurzelansatz, und das Hypokotyl ist weitgehend gerade (Abb. 1b). Infolge der Belichtung kommt es offenbar zu einer rascheren und intensiveren negativ geotropischen Reaktion der Sproßachse des Keimlings. In Abb. 2 sind repräsentative Dunkelkeimlinge (72 Std nach Aussaat, 25° C) repräsentativen, gleich-

altrigen, belichteten Keimlingen gegenübergestellt, die 24 und 48 Std nach Aussaat je 4 min Hellrot erhielten (Hellrot-Standardfeld, s. Methodik). Mit der Richtung des verwendeten Lichts hat, wie wir geprüft haben, die beobachtete Reaktion nichts zu tun: Wenn wir die Keimlinge durch das Keimpapier hindurch mit einer entsprechenden Intensität von unten bestrahlen, tritt genau derselbe Effekt auf wie bei einer Bestrahlung von oben. Normalerweise fällt das Licht vertikal von oben auf das horizontal liegende Keimpapier. — Auch mit Phototropismus hängt die beobachtete Reaktion nicht zusammen: Die Strahlung unseres Standard-Hellrotfeldes (s. Methodik) kann bei *Sinapis*-Keimlingen keine meßbare phototropische Reaktion auslösen.

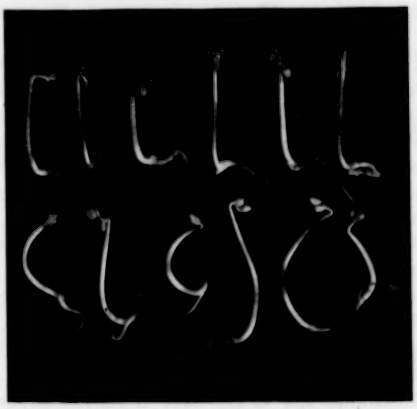


Abb. 2. Es sind repräsentative Dunkelkeimlinge (untere Reihe) repräsentativen, gleichaltrigen belichteten Keimlingen (obere Reihe) gegenübergestellt, die 24 und 48 Std nach Aussaat je 4 min Hellrot erhielten (die Keimlinge wurden 72 Std nach Aussaat photographiert)

Die beobachteten Phänomene lassen sich nach unserer Meinung nur durch die Annahme befriedigend erklären, daß durch die Belichtung die negativ geotropische Reaktionsfähigkeit der Keimlinge gesteigert wird.

Wir mußten herausfinden, wie man diesen Lichteffekt quantitativ erfassen kann. Wir haben verschiedene Möglichkeiten geprüft. Bewährt hat sich nur folgende Methode: Wir schneiden die Wurzel an der Grenze zwischen Hypokotyl und Wurzel und die Plumula in der Mitte des Plumula-Hakens ab (Abb. 1c). Dann verbinden wir die Mitten der beiden Schnittstellen durch eine Gerade und messen (in Millimeter) den größten Abstand dieser Geraden von der äußeren Begrenzung des Hypokotyls. Diese Strecke sei x. Die Größe x ist unsere Meßzahl. Es erscheint günstig, in Kurven und Tabellen $\frac{100}{x}$ anzugeben. Diese Größe $\frac{100}{x}$ ist dann — nach unserer Deutung — ein Maß für die Stärke der geotropischen Reaktion. Je größer $\frac{100}{x}$, um so rascher und intensiver hat der Keimling negativ geotropisch reagiert.

In der Literatur gibt es mehrere Angaben über eine Beeinflussung der geotropischen Reaktionsfähigkeit, besonders von Rhizomen und Ausläufern, durch die Lichtverhältnisse. Darauf soll in der Diskussion kurz eingegangen werden.

3. Methodik

(vgl. hierzu die Angaben bei Mohr 1959a, b)

a) Material. Das verwendete Samenmaterial ist dasselbe wie in den vorangegangenen Arbeiten.

b) Bestrahlungsanlagen. Die verwendeten Bestrahlungsanlagen sind bei Mohr und Schoser (1959) beschrieben. Das Dunkelrot (= DR) wurde mit den Cellophan-Farbfiltern hergestellt. Das Hellrot (= HR) wurde noch durch 2 mm rotes Plexiglas (Rot 1, Röhm und Haas, Darmstadt) gefiltert. Die Intensität im HR-Standardfeld wurde dadurch um etwa 40% herabgesetzt. Auf die Verwendung von Strahlung mit Wellenlängen < 600 mμ wurde in der ganzen Arbeit verzichtet, um störende Einflüsse des Phototropismus mit Sicherheit zu vermeiden.

c) Der allgemeine Versuchsansatz. Alle Versuche werden bei 25° C durchgeführt. Die Samen werden auf 3 Lagen Keimpapier (Charybdis-Löschpapier 9142/11) in farblosen Kunststoffbehältern („Gerda"-Kühlschrankbehälter) ausgesät. Das Keimpapier wird vor der Saat 15 Std in Leitungswasser gequollen, dann wird das freie Wasser abgegossen. Pro Behälter werden 25 Samen etwa äquidistant auf 3 konzentrischen Kreisen mit Radius 2,5, 1,5, und 0,5 cm ausgesät. Nach der Saat werden 4 ml Leitungswasser zugefügt. Bei Beendigung der Versuche ist stets noch freies Wasser vorhanden. Die relative Luftfeuchtigkeit in den Behältern ist also während der Dauer der Versuche hoch und konstant. 24 Std nach der Aussaat haben praktisch alle Samen gekeimt (vgl. Abb. 1 bei Mohr 1959a). 24 und 48 Std nach der Aussaat setzt die Bestrahlung ein, die maximal je 256 min dauert. Das Bestrahlungsprogramm ist an beiden Tagen dasselbe. Während der Bestrahlung sind die Gefäße mit Glasplatten (anstelle des Deckels) abgedeckt. 72 Std nach Aussaat erfolgt die Auswertung. Es wird, wie in Abschnitt 2 skizziert, die Größe x bestimmt. Zu Beginn der Auswertung kommen alle Gefäße des Ansatzes in einen Kühlschrank (+ 2 bis 4° C). Die Gefäße werden dann einzeln aus dem Kühlschrank genommen. Der allgemeine Versuchsansatz und die Standardbedingungen müssen genau eingehalten werden, wenn die Resultate quantitativ reproduzierbar sein sollen.

Tabelle 1. *Mittelwerte aus 8 Parallelversuchen.*

Der angegebene Mittelwert $\frac{100}{x}$ wurde aus den Mittelwerten der Einzelversuche gebildet.

Tägliche Bestrahlung	Mittelwert $\frac{100}{x}$	Mittlerer Fehler des arithmetischen Mittels von $\frac{100}{x}$	Zahl der Parallelversuche
4 min HR[1]	25,8	±0,47	8
4 min DR[1]	21,7	±0,46	8
4 min HR—4 min DR .	22,5	±0,65	8
Dunkelkontrolle	18,9	±0,14	8

[1] Abkürzungen: HR = Hellrot, DR = Dunkelrot, NER = Niederenergiereaktion, HER = Hochenergiereaktion.

d) Fehlerbetrachtung. Pro Behälter werden 25 Samen ausgesät, 18 Keimlinge werden ausgewertet, die 7 kleinsten (hinsichtlich der Länge des Hypokotyls) werden verworfen. In den Kurven und Tabellen dieser Arbeit sind stets Mittelwerte aus mindestens 4, meist aber mehr Einzelversuchen, die innerhalb eines kurzen Zeitraums durchgeführt wurden, angegeben. Die Tabelle 1 gibt einen Eindruck von

der Variation der Mittelwerte von $\frac{100}{x}$ der Einzelversuche, die zu dem Gesamtmittelwert $\frac{100}{x}$ zusammengefaßt werden.

Während längerer Perioden zeigte der Dunkelwert von x (und entsprechend auch die Werte der belichteten Ansätze) gewisse Schwankungen, die wahrscheinlich auf Änderungen des Materials zurückgehen. Der prinzipielle Verlauf der Kurven war jedoch, bezogen auf den Dunkelwert, weitgehend derselbe, so daß, grob gesehen, die Kurven mitsamt dem Dunkelwert lediglich auf der Ordinate etwas verschoben erscheinen. Wir geben in den Kurven und Tabellen stets den Mittelwert der Dunkelkontrollen für den Zeitraum an, in dem die jeweiligen Bestrahlungsexperimente durchgeführt wurden.

Aus morphologisch-anatomischen Gründen kann der Wert x praktisch nicht $= 0$ werden, sondern man erhält einen Endwert (Saturierungswert), den man praktisch nicht unterschreiten kann. Die kleinsten, bei unseren Bestrahlungsprogrammen erzielten Werte von x lagen im Bereich von 2,7 mm. Ein gewisser Fehler bei der Messung von x kann dadurch entstehen, daß die verwendete Bestrahlung auch die Hypokotyllänge etwas verkürzt, verglichen mit der Dunkelkontrolle. Es war nach unseren früheren Erfahrungen jedoch nicht zu erwarten, daß die relativ kurzen Bestrahlungszeiten (maximal 256 min pro Tag) einen starken Einfluß auf das Hypokotylwachstum ausüben würden (vgl. auch Tabelle 2).

Tabelle 2. *Der Einfluß der längsten verwendeten Bestrahlungen auf die Endlänge des Hypokotyls.*
(HR- bzw. DR-Standardfeld)

Bestrahlung pro Tag	Länge des Hypokotyls 72 Std nach Aussaat (mm)
256 min HR . . .	21,6
256 min DR . . .	22,9
Dunkelkontrolle .	26,4

4. Experimentelle Ergebnisse

a) Prinzipiell handelte es sich darum nachzuprüfen, ob der Lichteffekt auf die geotropische Reaktion in den Grundzügen übereinstimmt mit dem Lichteffekt auf die Morphogenese, d.h. ob auch die Änderung der geotropischen Reaktionsfähigkeit nur eine Manifestation der durch Licht im Rahmen der NER und HER verursachten, fundamentalen Umsteuerung des Stoffwechsels der Keimlinge ist. Diese „fundamentale Umsteuerung" hatten wir aus den bisherigen Arbeiten zur Photomorphogenese erschließen müssen. — Die Abb. 3 und 4 zeigen die Grundexperimente im HR- und im DR-Feld (Energie-Effektkurven). Der Anstieg zwischen 16 und 256 min HR geht praktisch ganz — wie wir in Analogie zu den früheren Experimenten geprüft haben — auf die NER zurück. — Diese Kurven sind sehr ähnlich wie die entsprechenden Kurven für die verschiedenen, von uns bereits untersuchten Photomorphosen der *Sinapis*-Keimlinge (gleiches Bestrahlungsprogramm, gleiche Standardbedingungen). Wir dürfen daher den Schluß ziehen, daß auch die Änderung der geotropischen Reaktionsfähigkeit nur eine Manifestation der fundamentalen Stoffwechselumsteuerung ist, die im belichteten Keimling im Rahmen der NER und der HER eintreten.

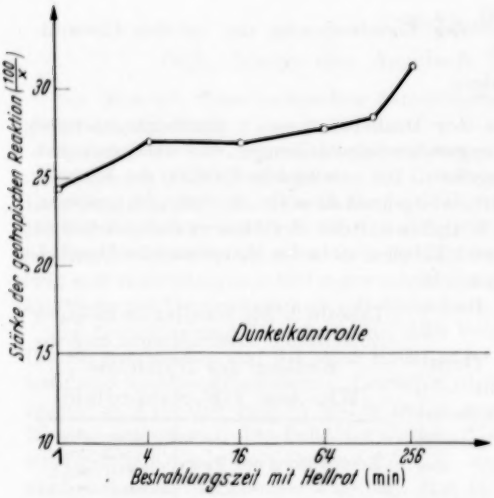


Abb. 3. Der Faktor $\frac{100}{x}$, der nach unserer Auffassung der Stärke der geotropischen Reaktion proportional ist, in Abhängigkeit von der täglichen Bestrahlungszeit im Standard-Hellrotfeld

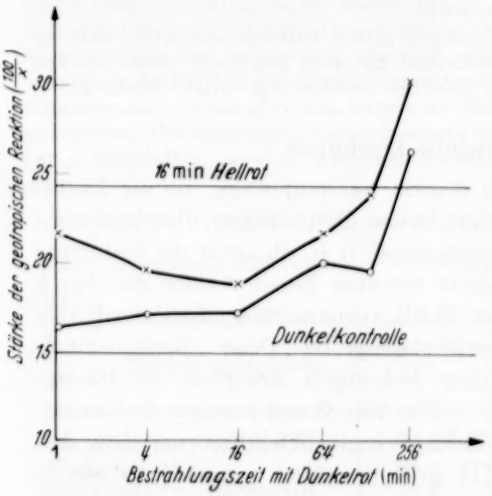


Abb. 4. Der Faktor $\frac{100}{x}$ in Abhängigkeit von der täglichen Bestrahlungszeit im Standard-Dunkelrotfeld. Kreise: Dunkelkeimlinge ohne Vorbehandlung. Kreuze: Die Keimlinge wurden unmittelbar vor dem Einsetzen der Dunkelrot-Bestrahlung mit 16 min Hellrot bestrahlt

b) Der hier beschriebene Lichteffekt verdient, wie wir glauben, allgemeines Interesse. Für die weitere, eingehende Bearbeitung der Zusammenhänge zwischen der NER und der HER, an denen wir primär interessiert sind, ist jedoch dieser Effekt über längere Zeit hinweg quantitativ nicht konstant genug. Auch die schnelle Saturierung (x erreicht rasch den kleinstmöglichen Wert) wirkt sich sehr ungünstig aus. Wir haben deshalb lediglich einige weitere Experimente vorgenommen, die unabhängig von den Grundexperimenten die Beteiligung der HER nachweisen sollten. Die Experimente wurden durch die schnelle Saturierung unserer Reaktionsgröße sehr erschwert. Die Wirksamkeit des DR im Rahmen der HER tritt z.B. bei dem früher bewährten Ansatz: 4 min HR — 256 min monochromatische Strahlung — 4 min HR nicht klar heraus, weil sich der maximale Wert von $\frac{100}{x}$ praktisch schon mit der NER allein (HR-Feld) im Verlauf von 4 Std erzielen läßt (d.h. man

Tabelle 3. *Einige Bestrahlungsprogramme zur Demonstration der HER* (HR- bzw. DR-Standardfeld)

Bestrahlung pro Tag	$\frac{100}{x}$
4 min HR	29,9
4 min DR	21,7
128 min HR	31,4
128 min DR	31,9
128 min DR + 4 min HR	34,4
Dunkelkontrolle	19,8

erreicht mit dem Bestrahlungsprogramm: 4 min HR — 256 min Dunkel — 4 min HR praktisch schon den jeweils erzielbaren Saturierungswert für $\frac{100}{x}$). Für den Nachweis der HER bleibt eben, wenn man die Keimlinge HR-saturiert ins Dunkel bringen will (Nachbelichtung mit HR), stets nur ein schmaler Bereich übrig. — Schließlich ließ sich der Einfluß der HER (also die den HR-Effekt überragende Wirkung von DR bei längeren Belichtungszeiten mit höherer Intensität) bei den in Tabelle 3 zusammengestellten Experimenten etwas klarer zeigen.

Die stärkere Wirkung des DR im Bereich der HER äußert sich besonders dann, wenn durch die Nachbelichtung mit 4 min HR die Keimlinge hinsichtlich der NER praktisch HR-saturiert werden.

5. Diskussion

a) Aus den Resultaten dieser Arbeit möchten wir den Schluß ziehen, daß die negativ geotropische Reaktionsfähigkeit der jungen Keimlinge von *Sinapis alba* in derselben Weise durch Licht gesteuert wird wie die Morphogenese dieser Keimlinge. Die lichtbedingte Zunahme der geotropischen Reaktionsfähigkeit wäre also *eine* Manifestation der nach Belichtung eintretenden, fundamentalen Änderungen im Zustand des Keimlings. Über die kausalen Verhältnisse, die zwischen der photochemischen Reaktion und dem unmittelbar beobachtbaren Effekt eingeschaltet sind, läßt sich indessen nichts Sicheres aussagen. — Zum Reversiblen HR-DR-Reaktionssystem oder zur HER als solchen liefert diese Arbeit keine Einsichten, die über die früheren Resultate (vgl. Mohr 1959a, b) hinausgehen. Das Hauptaugenmerk in dieser Arbeit muß auf das Faktum gerichtet werden, daß offenbar die geotropische Reaktionsfähigkeit eines Dikotylen-Keimlings in derselben Weise wie die Morphogenese durch die Belichtungsverhältnisse, denen der Keimling ausgesetzt wird, beeinflußt werden kann. Die geringe Entwicklung des geotropischen Reaktionsvermögens im Dunkeln muß als eine Etiolementerscheinung aufgefaßt werden. — Eine Konsequenz ergibt sich aus den vorliegenden Beobachtungen: Auch bei den negativ geotropischen Sproßachsen müssen wohl Experimente zum Geotropismus unter genau standardisierten Belichtungsverhältnissen durchgeführt werden.

b) Daß die geotropische Reaktionsfähigkeit gewisser pflanzlicher Organe durch die Belichtungsverhältnisse beeinflußt werden kann, ist schon früh erkannt worden (Literaturangaben z. B. bei Zimmermann 1927 oder Rawitscher 1932). Man kann hierbei 2 Gruppen von Phänomenen unterscheiden: die von den Belichtungsverhältnissen abhängige geotropische Reaktion gewisser Luftsprosse, Rhizome, Ausläufer und Seitenwurzeln und die quantitative Modifizierung der normalerweise

negativ geotropischen Reaktion der Sproßachsen von Keimlingen oder Gras-Koleoptilen.

Seit den Arbeiten von Stahl (1884) und Czapek (1895) ist bekannt, daß bei gewissen Rhizomen und bei Seitenwurzeln erster Ordnung die Richtung des Wachstums durch die Lichtintensität (Weißlicht) bestimmt wird. Durch intensive Belichtung wird bei diesen Organen eine starke *positiv* geotropische Reaktion ausgelöst, so daß etwa horizontal wachsende Rhizome, die ins Licht gelangen, schnell vertikal nach unten wachsen. Mit Phototropismus haben diese Phänomene, wie die Autoren zeigten, nichts zu tun, sondern es ändern sich offenbar die geotropischen Eigenschaften dieser Organe in Abhängigkeit von den Lichtverhältnissen. Auch die im Dunkeln horizontal wachsenden („transversal geotropischen") Rhizome von *Equisetum* werden unter dem Einfluß des Lichts positiv geotropisch (Ludwigs 1911). Auch an manchen plagiotropen, oberirdischen Organen hat man — ähnlich wie an den unterirdischen — beobachtet, daß sie im Licht andere geotropische Eigenschaften zeigen als im Dunkeln (im Dunkeln oder bei sehr niedrigen Lichtintensitäten erfolgt eine Aufrichtung in die Vertikale). Man hat daraus geschlossen, daß offenbar im Dunkeln der negative Geotropismus verstärkt auftritt. Schon Czapek (1895) hat nachweisen können, daß auch hier der Phototropismus nicht beteiligt ist. Langham (1941) glaubte zwar — auf Grund von Experimenten mit Ausläufer bildenden tropischen Pflanzen —, daß ein negativer Phototropismus für die horizontale Orientierung im Starklicht ausschlaggebend sei, Palmer (1956) jedoch, der diese Angaben an tropischen Pflanzen nachprüfte, konnte keinen negativen Phototropismus der betreffenden Sproßachsen finden. Palmer kam zu dem Schluß, daß bei den untersuchten Pflanzen das lichtbedingte, plagiotrope Wachstum dadurch zustande kommt, daß in den Sprossen eine positiv geotropische Reaktion induziert wird. Dadurch wird der offenbar stets vorhandenen negativ geotropischen Tendenz der Sprosse entgegengewirkt. Bei einigen tropischen Gräsern konnte Palmer sogar zeigen, daß mit der Hauptpflanze verbundene, verdunkelte Ausläufer zum plagiotropen Wachstum übergehen, wenn man die Hauptpflanze belichtet.

Es gibt eine Reihe von Angaben in der Literatur, die darauf hindeuten, daß durch die Vorbelichtung einer Keimpflanze die negativ geotropische „Empfindlichkeit" bzw. Reaktionsfähigkeit *herabgesetzt* wird (meist wurde der Geotropismus der Gramineen-Koleoptile geprüft, z. B. Krones 1914, Stoppel 1923, Frank 1951). War die Zeit zwischen Ende der Belichtung und Beginn der geotropischen „Reizung" kurz (etwa 1 min), so fand Frank jedoch eine *verstärkte* Wirkung der geotropischen „Standard-Reizung" (*Avena*-Koleoptile). Bei *Phycomyces*-Sporangiophoren setzt (nach Pilet 1956) eine vorausgegangene Belichtung die geotropische „Empfindlichkeit" herab. — Andererseits gibt Pringsheim (1909) an, daß etiolierte und grüne Pflanzen ihre geotropische Krümmung gleich schnell beginnen, wenn sie im Dunkeln waagrecht gelegt werden, und Krones (1914) fand, daß der eben skizzierte Unterschied zwischen vorbelichteten und Dunkelkeimlingen *(Avena)* verschwindet, wenn die geotropische Induktionszeit sehr lang ist. Dies ist bei unseren Versuchen der Fall.

Genauere Angaben über Dikotylenkeimlinge, die unser spezielles Problem betreffen würden, konnten wir in der Literatur nicht finden. Sperlich (1912) führt zwar auch für *Sinapis alba* einige Beobachtungen hinsichtlich der Krümmungsverhältnisse im basalen Hypokotylbereich bei einseitiger Schwerkraftwirkung bzw. auf dem Klinostaten an; da sein Hauptinteresse jedoch dem Plumula-Haken gilt, liefern diese gelegentlichen Beobachtungen wohl keinen zuverlässigen Beitrag zu unserem Problem.

Summary

Our experiments indicate that the negative geotropic reactivity of dark-grown mustard seedlings (*Sinapis alba* L.) is greatly increased when the seedlings are irradiated with visible light. Obviously in irradiated seedlings the geotropic reaction is more rapid and intense. The results of this paper point out that light controls the geotropic behaviour in exactly the same way as morphogenesis. Apparently the increased geotropic reactivity of the irradiated seedlings is only one manifestation of the basic metabolic changes which occur in the dark-grown seedling after the absorption of light and which finally lead to photomorphogenesis.

In earlier papers we have been able to show that photomorphogenesis in these mustard seedlings is controlled by two basic photoreactive systems: the reversible red far — red system and the so called blue far — red system. The same, probably, is true for the control of the geotropic reactivity under our standard experimental conditions.

Der Deutschen Forschungsgemeinschaft möchten wir auch an dieser Stelle herzlich danken.

Literatur

Butler, W. L., K. H. Norris, H. W. Siegelman and S. B. Hendricks: Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 1703—1708 (1959).

Czapek, F.: Über die Richtungsursachen der Seitenwurzeln und einiger anderer plagiotroper Pflanzenteile. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I **104**, 1197—1259 (1895).

Frank, F.: Der Einfluß des Lichts auf die geotropische Reaktion. Diss. Tübingen 1951.

Hendricks, S. B., and H. A. Borthwick: Photocontrol of plant development by the simultaneous excitations of two interconvertible pigments. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 344—349 (1959a).

Hendricks, S. B., and H. A. Borthwick: Photocontrol of plant development by the simultaneous excitation of two interconvertible pigments. II. Theory and control of anthocyanin synthesis. Bot. Gaz. **120**, 187—193 (1959b).

Krones, F. E.: Einfluß des Lichts auf den Geotonus. S.-B. Akad. Wiss. Wien, math.-nat. Kl., Abt. I **123**, 801—835 (1914).

Langham, D. G.: The effect of light on growth habit of plants. Amer. J. Bot. **28**, 951—956 (1941).

Ludwigs, K.: Untersuchungen zur Biologie der Equiseten. Flora (Jena) **103**, 385 bis 440 (1911).

Mohr, H.: Der Einfluß monochromatischer Strahlung auf das Längenwachstum des Hypokotyls und auf die Anthocyanbildung bei Keimlingen von *Sinapis alba* L. (= *Brassica alba* Boiss). Planta (Berl.) **49**, 389—405 (1957).

Mohr, H.: Der Lichteinfluß auf die Haarbildung am Hypokotyl von *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 109—124 (1959a).

Mohr, H.: Der Lichteinfluß auf das Wachstum der Keimblätter bei *Sinapis alba* L. Planta (Berl.) **53**, 219—245 (1959b).

Mohr, H.: Photomorphogenetische Reaktionssysteme in Pflanzen, Teil 1. Ergebn. Biol. **22**, 67—107 (1960).

Mohr, H., u. G. Schoser: Eine Interferenzfilter-Monochromatoranlage für photobiologische Zwecke. Planta (Berl.) **53**, 1—17 (1959).

Palmer, J. H.: The nature of the growth response to sunlight shown by certain stoloniferous and prostrate tropical plants. New Phytologist **55**, 346—355 (1956).

Pilet, P. E.: Sur l'apogéotropisme du Phycomyces. Experientia (Basel) **12**, 148 bis 149 (1956).

Pringsheim, E.: Einfluß der Beleuchtung auf die heliotropische Stimmung. Beitr. Biol. Pflanzen **9**, 263—305 (1909).

Rawitscher, F.: Der Geotropismus der Pflanzen. Jena: Gustav Fischer 1932.

Siegelman, H. W., and S. B. Hendricks: Photocontrol of anthocyanin formation in turnip and red cabbage seedlings. Plant Physiol. **32**, 393—398 (1957).

Sperlich, A.: Über Krümmungsursachen bei Keimstengeln und beim Monokotylenblatte nebst Bemerkungen über den Phototropismus der positiv geotropischen Zonen des Hypokotyls und über das Stemmorgan bei Cucurbitaceen. Jb. Bot. **50**, 502—653 (1912).

Stahl, E.: Einfluß des Lichtes auf den Geotropismus einiger Pflanzenorgane. Ber. dtsch. bot. Ges. **2**, 383—397 (1884).

Stoppel, R.: Beitrag zum Problem der Perzeption von Licht- und Schwerereiz durch die Pflanze. Jb. Bot. **62**, 563—593 (1923).

Zimmermann, W.: Die Georeaktionen der Pflanze. Ergebn. Biol. **2**, 116—256 (1927).

Dr. H. Mohr,
Botanisches Institut der Universität Tübingen, Wilhelmstr. 5

Planta 55, 67—107 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Bonn

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DAS PROTOPLASMA DER SIEBRÖHREN VON *PASSIFLORA COERULEA**

II. Mitteilung

ELEKTRONENOPTISCHE UNTERSUCHUNGEN

Von

RAINER KOLLMANN

Mit 21 Textabbildungen

(Eingegangen am 9. März 1960)

A. Das Fixierungsproblem

Die außerordentliche Labilität des Siebröhrenprotoplasten, auf die bereits in der vorhergehenden Mitteilung (KOLLMANN 1960) mehrmals hingewiesen wurde, zeigte sich den meisten Untersuchern vor allem immer wieder bei Fixierungsversuchen. Waren aber die bisherigen Methoden bereits für lichtmikroskopische Untersuchungen meist unzureichend, so mußten sie für die Analyse eventueller Feinstrukturen im Elektronenmikroskop sicher völlig unbrauchbar sein. Die Ungunst der Bedingungen weist vor allem in 2 Richtungen: Einmal mußten die für Siebröhren bekannten Wundeffekte bei der Präparation berücksichtigt werden, und zum anderen waren beträchtliche Veränderungen bei der Entwässerung des ungewöhnlich stark hydratisierten Protoplasten zu erwarten. Letztere mußten vor allem bei nicht genügender Stabilisierung der Plasmabestandteile, d.h. also bei unzureichender Fixierung, eintreten.

Das Wundeffektproblem habe ich nun in Fortsetzung meiner lichtmikroskopischen Untersuchungen wie bereits HEPTON, PRESTON und RIPLEY (1955) sowie PRESTON (1958) durch geeignete Präparationsmethoden zu umgehen versucht. Es hatte sich ja gezeigt, daß die Siebröhren in schwach hypertonischer Saccharoselösung leichter unbeschädigt zu erhalten waren. Es mußte deshalb eine Methode gefunden werden, die Objekte ohne Schäden aus der Vorbehandlung in ein geeignetes Fixiermittel überzuführen. Osmiumtetroxyd wird für beste Erhaltung cytoplasmatischer Feinstrukturen heute allgemein erfolgreich verwandt. Jedoch hatten in letzter Zeit vor allem SITTE (1958) und STRUGGER (1959) betont, daß die verschiedenen Medien, in denen Osmiumtetroxyd angewandt werden kann, durchaus von unterschiedlicher Bedeutung für die

* Teilabdruck einer Dissertation der Math.-naturw. Fakultät der Universität Bonn (D 5). Das vollständige Exemplar kann an der obigen Stelle eingesehen werden.

einzelnen Plasmastrukturen sind. SITTE (1958) weist sicher mit Recht darauf hin, daß die Fixierungs-„Ergebnisse mit keiner Mischung für alle Zellteile zugleich optimal" sein können. Nun blieb aber gerade hierbei keine große Wahl, d. h., ich war bei den empfindlichen Siebröhren eigentlich bereits nur in eine bestimmte Fixierrichtung gewiesen: p_H und osmotischer Wert waren mir mit den Saccharoselösungen gewissermaßen vorgeschrieben, falls ich nicht schon gleich zu Beginn der ganzen Präparation größere Artefakte riskieren wollte. Es lag hier nahe, Osmiumtetroxyd direkt der Saccharoselösung, in der das Gewebe zuvor untersucht wurde, zuzugeben. Nun setzt jedoch das Plasma, infolge der entquellenden Wirkung von Saccharose, dem Eindringen von Osmiumsäure einen nicht geringen Widerstand entgegen. SITTE (mündliche Mitteilung) konnte an Fichtennadelgewebe feststellen, daß mit steigender molarer Saccharosekonzentration die Eindringungszeit des Fixiermittels zunimmt. Andererseits ist auch bekannt, daß die Eindringungsgeschwindigkeit von der Höhe der Konzentration einer OsO_4-Lösung abhängig ist. Eine möglichst rasche Fixierung ist in jedem Fall erstrebenswert, wenn gröbere Veränderungen der Feinstrukturen vermieden werden sollen (STRUGGER 1953). Deshalb verwandte ich Osmiumtetroxyd nicht in der sonst üblichen Konzentration von 1%, sondern fixierte in saccharosehaltigen 2%igen OsO_4-Lösungen.

B. Methodik

Wie schon für die lichtoptischen Untersuchungen beschrieben (KOLLMANN 1960), wurden auch hier abgeschnittene 15—20 cm lange Sprosse von *Passiflora coerulea* (Freiland- und Gewächshausmaterial) in Saccharoselösung vorbehandelt: 0,20 Mol Saccharose + 0,006 Mol KH_2PO_4 + 0,004 Mol K_2HPO_4; p_H der Lösung: 7; osmotischer Wert: 6,03 Atm.; Dauer der Vorbehandlung im „Vasenwasser": 12—18 Std.

Anschließend wurden etwa 2 cm lange Internodialsegmente in 0,25 Mol Saccharose + 0,006 Mol KH_2PO_4 + 0,004 Mol K_2HPO_4 übertragen und bis zur Präparation dort aufbewahrt. Aus der Mitte jeweils eines Segmentes wurden dann unter Saccharoselösung mit einem scharfen Rasiermesser 1 cm lange Sproßabschnitte für die weitere Präparation herausgetrennt. Bei der nun folgenden Herstellung von 3—5 mm langen tangentialen Handschnitten mit sehr scharfem Rasiermesser wurde peinlichst darauf geachtet, daß sowohl Objekt wie Messer stets durch Saccharoselösung feucht blieben. Nach jedem Schnitt schloß sich sofort eine lichtmikroskopische Voruntersuchung und somit Auswahl der für die weitere Behandlung brauchbaren Präparate an. Zunächst mußte geprüft werden, ob der jeweilige Schnitt gleichmäßig im Bereich ausdifferenzierter Siebröhren geführt war. Inhomogenität des Gewebes, besonders die Anwesenheit von Festigungs- neben meristematischem Gewebe, führte meist bei der anschließenden Entwässerung in den höheren Alkoholstufen zum Aufrollen und Verzerren der Schnitte. Sodann war natürlich der allgemeine Erhaltungszustand der präparierten Siebröhrenglieder von ausschlaggebender Bedeutung. Derselbe wurde nach dem Zustand des protoplasmatischen Wandbelages einer jeden Siebröhre, der meist an der Lage der Plastiden und dem Auftreten sog. artefizieller „Schlauchköpfe" vor den Siebplatten kenntlich war,

beurteilt. Nur derartig ausgesuchte Präparate wurden anschließend aus der gepufferten Saccharoselösung in das eiskalte Fixiergemisch übertragen. Fixiert wurde nach folgenden 3 Methoden, die zum Teil Varianten der von WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) für zoologische Objekte angegebenen Fixierlösungen darstellen:

I.

Stammlösung A: 100 ml 5% $K_2Cr_2O_7$-Lösung + 15 ml 2,5 n KOH.
Stammlösung B: 3,4% NaCl-Lösung.
Stammlösung C: 2,0% OsO_4-Lösung.

Das aus 1,25 ml Stammlösung A, 1,25 ml Stammlösung B und 2,5 ml Stammlösung C zusammengesetzte Fixiergemisch hatte einen $p_H = 7{,}45$ und einen osmotischen Wert = 8 Atm.

II.

(An Stelle von NaCl wird Saccharose eingesetzt)
Stammlösung A: 100 ml 5% $K_2Cr_2O_7$-Lösung + 15 ml 2,5 n KOH.
Stammlösung B: 34% Saccharoselösung.
Stammlösung C: 2% OsO_4-Lösung.
Zusammengesetzt wie oben: 1 Teil A + 1 Teil B + 2 Teile C; p_H etwa 7; 10 Atm.

III.

2% OsO_4 in 0,30 Mol Saccharose + 0,006 Mol KH_2PO_4 + 0,004 Mol K_2HPO_4; p_H etwa 7; 7,95 Atm.

Der p_H-Wert wurde mit der Wasserstoffelektrode gemessen und der osmotische Wert kryoskopisch bestimmt.

Dauer der Fixierung für alle 3 Fixiergemische: etwa 3 Std bei 0° bis + 3° C.

Im Anschluß an die Fixierung werden die Präparate wie üblich in einer isotonischen Tyrode-Lösung (6,8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,2 g $CaCl_2$, 0,1 g $MgCl_2$, 0,144 g NaH_2PO_4, 2,2 g $NaHCO_3$, 1 g Glucose, aqua dest. ad 1000 ml) bzw. Saccharose-Lösung (0,3 Mol) gewaschen und in steigender Alkoholreihe in monomeres Methacrylatgemisch (6 Teile Butylester: 1 Teil Methylester + 1% Benzoylperoxyd) übergeführt. Auf der Stufe des 70% Alkohols wurde nach WOHLFARTH-BOTTERMANN (1957) mit 1% Phosphorwolframsäure und 0,5% Uranylacetat kontrastiert. Vor der Polymerisation erfolgte eine weitere lichtmikroskopische Kontrolle der einzubettenden Präparate. Nur Siebelemente ohne sichtbare Verlagerung des Zellinhalts und mit gut wandständigem Protoplasten (Lage der Plastiden; s. Abb. 1) wurden weiter verarbeitet. Die Präparate wurden im flüssigen Methacrylat in 1—2 mm lange Stücke zerteilt und bei 40—60° C im Thermostaten polymerisiert.

Die im folgenden zu beschreibende Methode ermöglicht die gezielte Präparation einer für die elektronenmikroskopische Untersuchung günstigen Siebröhre. Unter einer Präparierlupe (Zeiss-Opton: 12—80fache Vergrößerung) wird vom Plexiglasblock das überflüssige Material mit einer Rasierklinge vorsichtig bis nahe an den waagerecht am Boden des Blockes liegenden Schnitt abgetragen. Der eingebettete Schnitt kann in reinem Glycerin (Brechungsindex von Glycerin = 1,45, von Polymethylmethacrylat = 1,50) unter einem Mikroskop auf celluläre Einzelheiten hin genau beurteilt werden. Bei schwacher Vergrößerung (Okular 12,5×, Objektiv 10×) wird nun mit einer sehr feinen Präpariernadel unter dem Mikroskop eine günstige Stelle, z. B. Siebplatte, im Gewebe markiert und anschließend unter der Präparierlupe der Block auf diese Marke zugespitzt. Eine öftere Kontrolle in Glycerin unter dem Mikroskop ermöglicht schließlich die Herauspräparation einer gewünschten Schnittfläche von nur 1—2 Zellbreiten zum eigentlichen Ultramikrotomieren.

Es wurden auf diese Weise nur Siebelemente im Elektronenmikroskop untersucht, die bereits lichtmikroskopisch eine gute Strukturerhaltung verrieten. Später zeigte sich dann, daß auch nur derartige Zellen im sublichtmikroskopischen Bereich befriedigende Strukturerhaltung zeigten. [Vgl. hierzu auch die gleichartigen Beobachtungen von PERNER (1958) und STRUGGER (1959)]. Die elektronenmikroskopische Untersuchung hat schließlich ergeben, daß alle drei erwähnten Fixierungsmethoden unterschiedlich brauchbare Ergebnisse lieferten. Besonders erfolgreiche Beobachtungen bei der erstgenannten Fixierungsart (2% OsO_4 in 0,30 Mol gepufferter Saccharoselösung) können zufällig sein und erlauben bei der bekannten Launenhaftigkeit elektronenmikroskopischer Präparationstechnik hier noch keine Schlußfolgerung zur Bevorzugung einer der 3 Varianten. Weitere Untersuchungen mögen hier in Zukunft einen eventuellen Unterschied herausstellen.

Die Herstellung der Ultradünnschnitte (300—1000 Å, vgl. BACHMANN und SITTE 1959) erfolgte auf einem Ultramikrotom nach SITTE. Es wurden Glasmesser verwandt, die Schnitte auf 10% Alkohol aufgefangen und gegebenenfalls mit Chloroform gestreckt. Die elektronenoptischen Untersuchungen wurden an einem Akashi-Elektronenmikroskop (Tronscope Modell TRS-50) ausgeführt[1].

Als Aufnahmematerial diente Agfa-Agepe 6×6 Film, der mit Agfa-Varitol H bzw. N entwickelt wurde.

C. Allgemeine Strukturerhaltung

Die Beurteilung von Cytoplasmastrukturen in den Siebröhren ist mit Schwierigkeiten verschiedenster Art behaftet. So fehlt zunächst einmal jeglicher Vergleich mit Zellstrukturen normaler ausdifferenzierter Zellen. In der relativ jungen elektronenmikroskopischen Erforschung der Pflanzenzelle gelangten bisher weitgehend nur Meristeme zur Untersuchung. Die spärlichen Angaben über ausdifferenzierte Gewebe höherer Pflanzen deuten aber darauf hin, daß Pflanzenzellen im Verlaufe ihrer Entwicklung erhebliche Veränderungen ihrer Plasmastrukturen erfahren (LUND, VATTER und HANSON 1958). Nun hatten jedoch bereits die lichtmikroskopischen Untersuchungen ergeben, daß die Siebelemente auch in der Reihe der ausdifferenzierten Zellen eine Sonderstellung einnehmen. Es kommt hinzu, daß trotz vorsichtigster Präparation und Fixierung mit einem gewissen Wundeffekt gerechnet werden muß, der

[1] Mein besonderer Dank gilt der Firma Akashi Seisakusho, Ltd., Tokyo, vor allem Herrn H. TOCKIGI (Chief Engineer of E.M. Section Research Dept. Akashi Seisakusho, Ltd., Tokyo) für die Unterweisung in der Technik der Ultramikroskopie.

Ferner danke ich Herrn Dozent Dr. K. E. WOHLFARTH-BOTTERMANN (Vorstand des Zentrallaboratoriums für angewandte Übermikroskopie Bonn), der mir die Einarbeitung am Ultramikrotom ermöglichte und mich mit manchem wertvollen Rat unterstützte.

Die Deutsche Forschungsgemeinschaft stellte das Elektronenmikroskop zur Verfügung, wofür auch hier der Dank ausgesprochen sei.

nicht nur im eigentlichen Cytoplasma, sondern auch an den Feinstrukturen der plasmatischen Zellorganellen Veränderungen hervorrufen kann. Die wiederholt beschriebene Empfindlichkeit der Siebröhren-Plastidenmembranen (MEYER 1883; CRAFTS 1951; MCGIVERN 1957) sei hier als Beispiel angeführt. Zu erwarten war allerdings, daß zumindest die den Siebröhren benachbarten Parenchym- und Geleitzellen von Wundreizen weitgehend verschont blieben. Ich habe deshalb auch diese Zellelemente immer wieder bei der Beurteilung von Strukturen in den Siebröhren vergleichend untersucht.

Zunächst mußte natürlich darauf geachtet werden, daß die zuvor lichtoptisch geprüfte Wandhaftung des Siebröhrenplasmas auch im sublichtmikroskopischen Bereich genügend erhalten war. Weiterhin wurde den beobachteten Feinstrukturen nur dann eine Bedeutung zuerkannt, wenn der Erhaltungszustand bekannter Strukturen, z. B. von Organellen in den unmittelbar benachbart liegenden Zellen, optimal war. Es interessierte hierbei vor allem die Darstellung der Plastiden, Mitochondrien, Kernmembranen und unter Umständen der Plasmagrenzschichten. Der Feinbau dieser Zellorganellen ist an anderen Objekten in der Literatur hinreichend beschrieben und bietet somit gute Vergleichsmöglichkeiten mit unseren Befunden.

Als Ergebnis einer Vielzahl von vergleichenden Untersuchungen sei festgehalten, daß bei guter Parenchymzellen-Fixierung im Phloem auch der Erhaltungszustand der Siebröhren-Inhaltsbestandteile recht brauchbar war. Nur in wenigen Fällen zeigte sich bei einer gelungenen Fixierung von Nachbarzellen eine schlechtere Strukturerhaltung in den Siebröhren. Besonders eindrucksvoll erwies sich die Übereinstimmung in der Darstellung von Mitochondrien, wie später noch näher zu erörtern ist. Die oben erwähnte Methode, den Siebröhren-Erhaltungszustand nach demjenigen der benachbart liegenden Parenchymzellen zu beurteilen, erwies sich also als recht brauchbar.

D. Gesamtüberblick: Siebröhre — Nachbarzelle

Hatten bereits lichtmikroskopische Untersuchungen erkennen lassen, daß der Plasmawandbelag in Siebröhrengliedern und Nachbarparenchymzellen eine recht unterschiedliche Stärke und Dichte aufweist, so wurde dies im elektronenmikroskopischen Bild bei der stärkeren Vergrößerung noch um vieles deutlicher. Die Abb. 2 zeigt, daß der trennenden Zellwand auf der Siebröhrenseite eine sehr zarte, nur 0,1—0,3 μ starke Plasmatapete anliegt, während in der benachbarten Parenchymzelle ein nahezu vier- bis fünfmal mächtigerer Plasmabelag gegenüberliegt. Gemeinsam ist beiden Protoplasten, daß sie im Gegensatz zu meristematischen Pflanzenzellen (vgl. die Literatur bei STRUGGER 1957; HODGE, MARTIN und MORTON 1957; LUND, VATTER u. HANSON 1958;

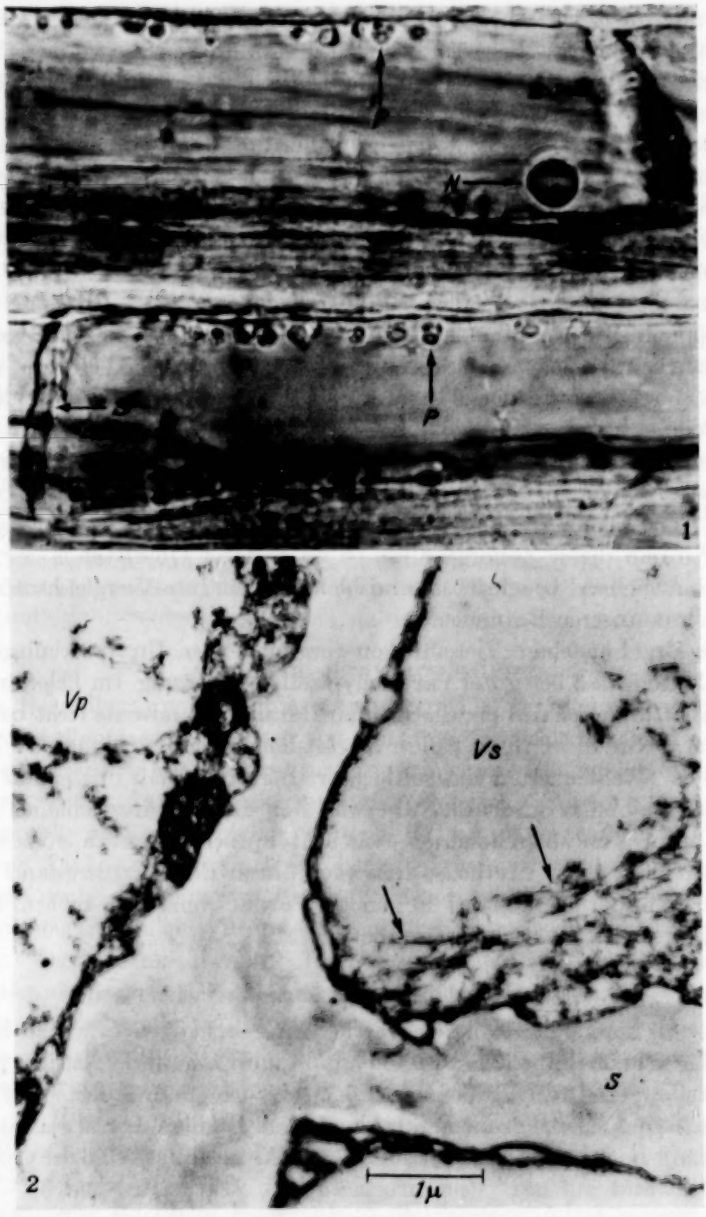


Abb. 1. Lichtoptische Kontrolle der fixierten Siebelemente vor der Polymerisation in monomerem Methacrylat: Die Lage der stärkeführenden Plastiden (*P*) zeigt, daß der Siebröhrenprotoplast gut wandständig ist. Schleimakkumulationen vor den Siebplatten werden nicht beobachtet. Fixierung: 2 % OsO_4 in 0,30 Mol Saccharose + 0,006 Mol KH_2PO_4 + 0,004 Mol K_2HPO_4; p_H etwa 7; 7,95 Atm. Vergr. 1440:1, LM

Abb. 2. (Unterschrift auf gegenüberliegender Seite)

Perner 1958 und Sitte 1958) stark aufgelockerte Strukturen besitzen, wobei ein verstärktes Auftreten dichter membranöser und vesiculärer Strukturelemente deutlich ist. Wahrscheinlich stehen diese Erscheinungen mit der verstärkten Wasseraufnahme sich streckender Zellen und somit der weiteren Verteilung der einzelnen Elemente des Cytoplasmas im Zusammenhang. Wieweit jedoch die häufig beobachtete Koagulations- bzw. Vernetzungstendenz der Cytoplasmabestandteile derartiger Zellen ein Artefakt ist, läßt sich z. Z. noch nicht überblicken. Sicherlich sind sowohl Fixation wie vor allem Entwässerung stärker wasserreicher Cytoplasmaanteile mit besonders starken Entquellungs- und somit Koagulationsvorgängen dieser lockeren Eiweißstrukturen verbunden. So ist es zu verstehen, wenn z. B. Hodge, Martin und Morton (1957) auf die erheblichen Schwierigkeiten hinweisen, die ausdifferenzierte Pflanzenzellen im Gegensatz zum Meristem der Fixation entgegensetzen. Immerhin liegen auch begründete Angaben von Lund, Vatter und Hanson (1958) vor, nach denen die verstärkte Membranbildung im Plasma ausdifferenzierter Zellen (im Vergleich zum mehr granulären Plasma der meristematischen Zellen) mit einem natürlichen Strukturwechsel der Cytoplasmaanteile im Verlaufe der Streckungs- und somit Differenzierungsvorgänge des Gewebes im Zusammenhang stehen soll. Wohlfarth-Bottermann (1959) beschreibt für tierische und pflanzliche Zellen gewisse Korrelationen zwischen Struktur und Dynamik cytoplasmatischer Elemente, nach denen „das dichte Cytoplasma der jungen, sehr stark wachsenden Zellen durch eine erhöhte Viscosität gegenüber der lockeren und vacuolären Cytoplasmakonfiguration älterer Zellen ausgezeichnet sein" soll. Weitere Untersuchungen werden hier in Zukunft zeigen müssen, welche wirkliche Strukturierung dem Feinbau des Cytoplasmas ausdifferenzierter Pflanzenzellen eigen ist, und wieweit wir hier verstärkt mit Artefaktbildungen zu rechnen haben. In der vorliegenden Arbeit kann zunächst nur gezeigt werden, daß eine relativ gute Haftung des Plasmabelages an der Zellwand und der Erhaltungszustand von im folgenden zu beschreibenden Zellorganellen auch zum Schluß auf eine gelungene Fixierung des Grundplasmas in den Siebröhren und ihren Begleitelementen berechtigen. Der Einwand von Sitte (1958), daß eigentlich jeder Zellbestandteil seine spezielle Fixierung verlangt, soll hierbei nicht übersehen werden; doch war unter den angeführten besonderen Schwierigkeiten der Untersuchungsmethodik eine Arbeit in der hierzu erforderlichen Weise zunächst nicht durchführbar.

Abb. 2. Längsschnitt durch Siebelement (rechts) und Nachbarparenchymzelle (links) im Bereich der Siebplatte (*S*). Die unterschiedliche Stärke und Dichte von Siebröhren- und Parenchymzellenplasma ist zu beachten. In der Parenchymzellen-Vacuole (*Vp*) granulärfädige Zellsaftcoagulate, dagegen ausschließlich feinfädige Elemente (Pfeilmarkierung) im Siebröhrenglied, die vom Wandplasma ausgehend auch Bereiche der Vacuole zu durchziehen scheinen. Vergr. el.-mikr. 8000:1, Endvergr. 16000:1

E. Siebröhrenbestandteile

1. Der freie Nucleolus

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen zur Degeneration der Siebröhren-Zellkerne (KOLLMANN 1960) hatten ergeben, daß bei *Passiflora coerulea* in jedem Siebröhrenglied ein Restkörper persistiert, den wir mit ESAU (1947, 1950) als freien Nucleolus ansprechen konnten. Dieser für das ausdifferenzierte Siebröhrenglied charakteristische kugelige Einschluß war auch im Elektronenmikroskop wegen seiner besonderen hohen elektronenstreuenden Eigenschaft niemals zu übersehen. Der rundliche bis ellipsoide Körper mit einem Durchmesser von etwa $2 \times 3\ \mu$ wurde meist in der Nähe der Siebplatte frei in der Zellvacuole oder in sekundär durch Wundeinfluß hervorgerufenen Plasmaansammlungen getroffen. Es bleibt ungeklärt, ob diese Lage einem natürlichen Zustand entspricht, zumal ich mit Sicherheit den Nucleolus in lebenden Zellen stets in Wandnähe gesehen habe. Bei seiner Größe im Vergleich zum höchstens $^1/_2\ \mu$ dicken Plasmawandbelag würde eine sekundäre Verlagerung innerhalb des Siebröhrengliedes nicht verwundern.

Eine sehr feine Oberflächenstrukturierung der freien Nucleolen war bereits im Lichtmikroskop aufgefallen. Auch ESAU (1947) hatte für einige Pflanzen die artspezifische äußere Form und Oberflächenstruktur der freien Siebröhren-Nucleolen beschrieben.

Die stärkere Vergrößerung im elektronenmikroskopischen Bild (Abb. 3 und 5) zeigte nun, daß der beobachtete Körper sich aus einer Vielzahl unterschiedlich großer, stark osmiophiler Einzelbestandteile aufbaut. Diese ragen regellos „pseudopodienartig" aus ihrem Verband hervor und formen so die stark gebuchtete und gebuckelte Oberfläche ohne Andeutung einer gesonderten Membranbildung. Stärkste Vergrößerung (12000—15000×) und hohe Auflösung lassen dann weiterhin erkennen, daß die insgesamt stark elektronenstreuenden groben Bestandteile aus Untereinheiten charakteristischer Feinstrukturen aufgebaut werden. Je nach ihrer Lage zur Schnittrichtung werden wahrscheinlich längs-, schräg- oder quergeschnittene, langgestreckte Fibrillenbündel beobachtet. Die Fibrillen bauen in sehr konstanter Periode von etwa 135 Å anscheinend den ganzen Nucleolus auf. Elektronendichte Bereiche wechseln dabei mit durchlässigeren regelmäßig ab, so daß je nach Schnittrichtung einmal der Eindruck einer feinen Längsstreifung und zum anderen der eines exakten Gitters oder Netzwerkes entsteht. Besonders in den letzten quergeschnittenen Strukturbereichen des Dünnschnittes bekommen wir einen gewissen Einblick in den merkwürdigen Feinbau des untersuchten Körpers (Abb. 6 = Ausschnitt aus Abb. 5, s. Pfeilmarkierung): Innerhalb einer elektronendichten „Grundmatrix" befinden sich in hexagonaler Anordnung die vermutlich im

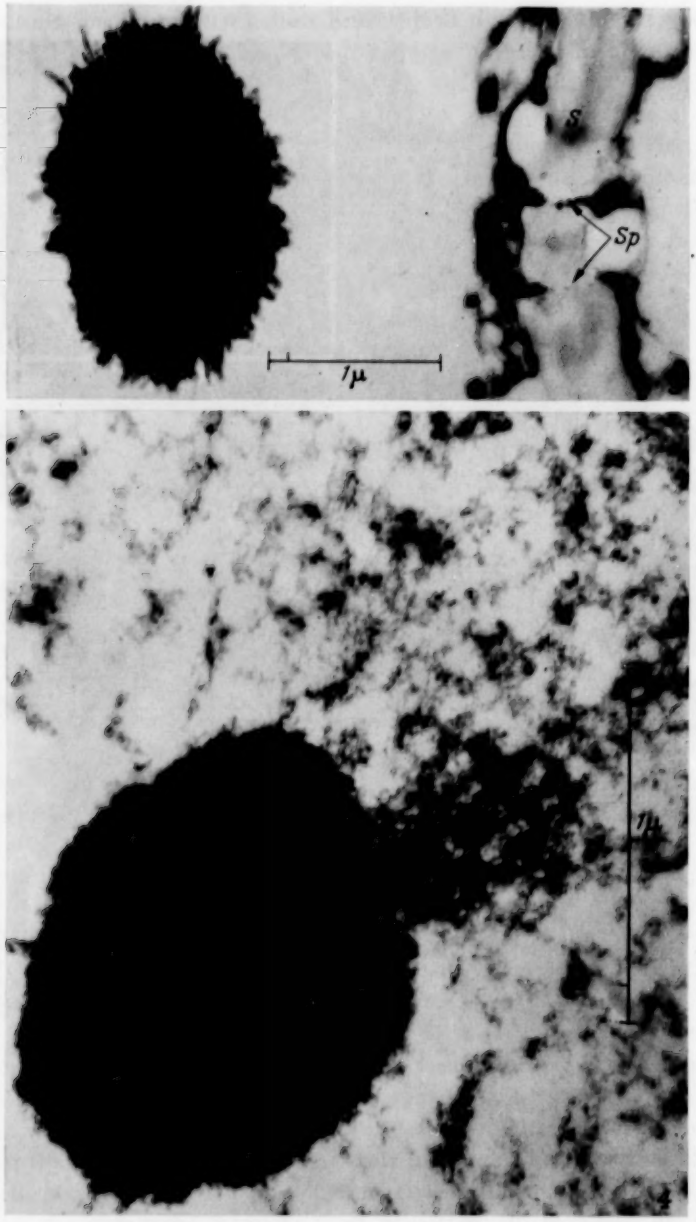


Abb. 3. Freier Nucleolus vor der Siebplatte (*S*) [2 Siebporen (*Sp*) im Längsschnitt getroffen]. Einzelne elektronendichte grobe „Bündel" treten „pseudopodien"-artig aus der Körperoberfläche heraus. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 24000:1

Abb. 4. „Abgabe" (?) nucleolarer Substanz in den Kernraum einer Phloemparenchymzelle. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

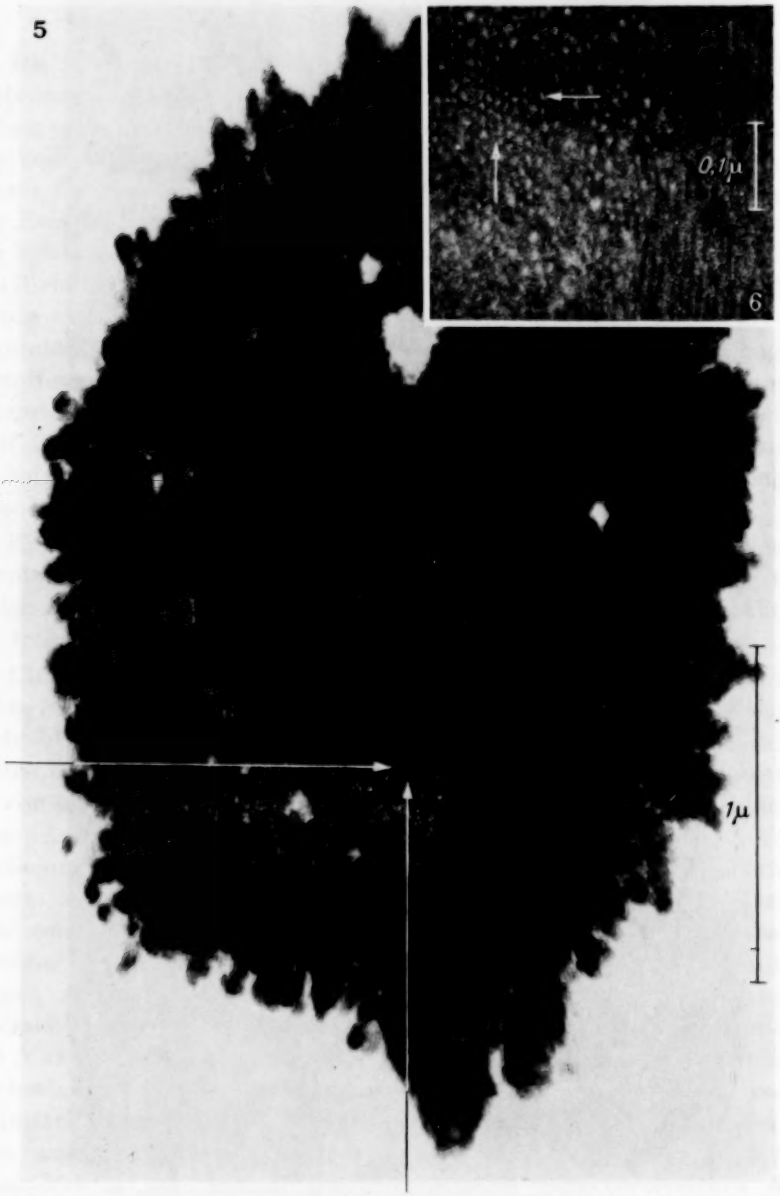


Abb. 5. Ultradünnschnitt durch einen freien Nucleolus mit charakteristischer Feinstruktur (Erklärung s. Text). Die Pfeilmarkierung verweist auf ein in Abb. 6 stärker vergrößertes, quergeschnittenes Fibrillenbündel. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Abb. 6. Hexagonale Anordnung der quergeschnittenen Nucleolus-Fibrillen (Ausschnitt aus Abb. 5, s. Pfeilmarkierung). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 120000:1

Querschnitt beobachteten hellen Einzelfibrillen. Man erkennt, daß dieselben, gemäß ihrer Packung, in drei bevorzugten Richtungen reihenweise angeordnet sind. Eine dicht hexagonale Packung von im Querschnitt kreisförmigen Elementen würde für jeden der 3 Winkel, unter denen sich die Seiten des zu konstruierenden Dreiecks schneiden, einen Betrag von 60° ergeben. Dieser zunächst erwartete Fibrillenaufbau erwies sich jedoch als unzutreffend. Stellte sich doch heraus, daß der mittlere Abstand jeweils zweier Fibrillen in den drei verschiedenen Richtungen unterschiedlich ist: 116, 135 und 156 Å. Das aus diesen

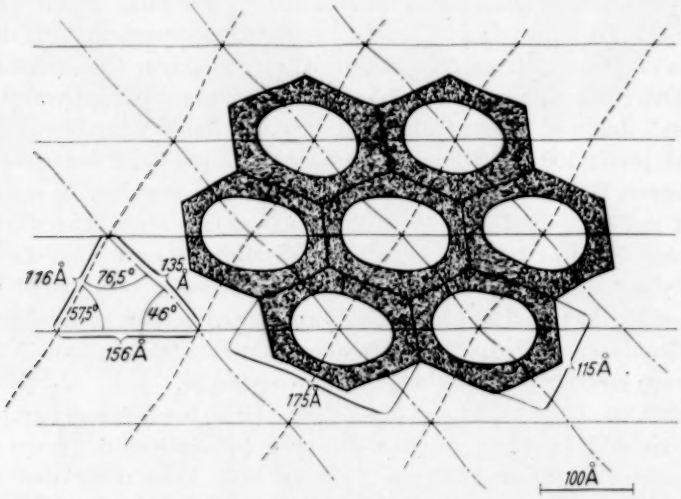


Abb. 6a. Schema des Nucleolus-Feinbaues (s. Text) im Bereich quergeschnittener Fibrillen

3 Seiten zu zeichnende Dreieck (Abb. 6a links) verfügt über die 3 Winkel 46, 57,5 und 76,5°. (In diesem Dreieck entspricht also jede der 3 Spitzen dem Mittelpunkt einer Fibrille und jede der 3 Seiten dem mittleren Abstand der einzelnen Fibrillen in drei verschiedenen Reihen.) Dieser Befund stimmt mit den Beobachtungen überein, daß die eventuellen Einzelfibrillen im Querschnitt nicht rund sind, sondern nahezu Ellipsen-Form besitzen. Die Achse dieser Ellipsen wäre annähernd in Richtung der 46°-Winkelhalbierenden orientiert. Da jedoch eine genaue Grenze zwischen hellen und dunklen Bereichen im elektronenmikroskopischen Bild bei der hohen Vergrößerung nicht mehr mit Sicherheit auszumachen ist, muß die wahre Form der angenommenen Fibrille und somit der genaue Aufbau des gesamten Körpers noch hypothetisch bleiben. An einigen günstigen Stellen entsteht mitunter der Eindruck, als ob die elektronendichte „Füllsubstanz" zwischen den quergeschnittenen Fibrillen derart verteilt ist, daß sie jeweils als Hülle die einzelnen Fibrillen umgibt und somit zum Bestandteil der Einzelfibrille wird. Diese würden sich demnach

mit je 6 Flächen ihrer Hüllen gegenseitig berühren (Abb. 6a rechts). Daß es sich bei der beschriebenen Figur tatsächlich um Fibrillenquerschnitte und nicht etwa um Kugelpackungen handelt, geht aus der guten Übereinstimmung dieser Meßwerte mit denen der längsorientierten Strukturen hervor. Übergänge zwischen beiden Orientierungsrichtungen sind häufig zu beobachten. Gelegentliche Störungen der Perioden (vgl. Abb. 5, rechte obere Bildhälfte) können einstweilen nicht erklärt werden, mögen jedoch mit den verschiedenen Schnittrichtungen zu den Ellipsenachsen im Zusammenhang stehen.

Die Beobachtungen lassen sich in folgendem zum Teil noch hypothetischen Bild der Nucleolus-Feinstruktur zusammenfassen (s. auch Abb. 6a): Die einzelnen über 5000 Å langgestreckten Grundfibrillen mit einem Durchmesser von etwa 175 × 115 Å verfügen über ein helles Fadenzentrum, das von einer elektronendichten Hülle umgeben ist. Eine Vielzahl (etwa 100 Einzelfibrillen) dieser Fibrillen sind hexagonal dicht zu gröberen Bündeln gepackt, und diese wiederum ergeben, zu sehr vielen regellos zusammengeballt, den lichtmikroskopisch sichtbaren Nucleolus.

Dieser Feinbau konnte in allen daraufhin untersuchten freien Nucleolen der Siebröhrenglieder von *Passiflora coerulea* beobachtet werden. Er ist charakteristisch für diese Körper und somit grundsätzlich zu unterscheiden von allem, was bisher über die Feinstruktur von Nucleolen in Kernen normaler Zellen bekannt geworden ist.

BERNARD, HAGUENAU und OBERLING (1952) beschreiben für tierische Zellen dicht geknäulte, grobe Filamente im Nucleolus, deren Durchmesser zwischen 90 und 180 mμ variieren soll. Eine mehr oder weniger derbe Fadenstruktur im Nucleolus tierischer Zellen fanden HORSTMANN und KNOOP (1957) sowie HORSTMANN (1958). Doch sollen derartige „Nucleolonemata" aus einzelnen 100—150 Å großen elektronendichten Granula aufgebaut sein. Reihen globulärer Elemente sowie eine ungeordnete dichte Verteilung derselben beobachtet SITTE (1958) in den Nucleolen von *Pisum*. BOPP-HASSENKAMP (1959) gibt an, daß pflanzliche Nucleolen im Pachytänstadium mit fibrillären Elementen (Durchmesser 115 Å) gleichmäßig ausgefüllt sind und somit über die gleichen Feinbauelemente wie der Kern verfügen.

Auch in der vorliegenden Arbeit wurden vergleichsweise immer wieder Nucleolen normaler ausdifferenzierter Phloemzellen untersucht. Abb. 7 zeigt das Kernkörperchen (*N*) im Kern einer Parenchymzelle, die dem Siebröhrenglied mit freiem Nucleolus in Abb. 5 unmittelbar benachbart lag. Granuläre Elemente füllen hier zum Teil regellos dicht gepackt, mitunter auch auf Fibrillen gereiht, den Nucleolus im Kern aus. Die elektronendichten Granula werden häufig auch im Kernraum getroffen. Mitunter erhält man Bilder (Abb. 4), die den Eindruck erwecken, als ob hier der Nucleolus Substanz in größeren Mengen direkt

Abb. 7. Phloemparenchymzelle; links unten der Kern (*K*) mit gut ausgebildeter Kernmembran (*Km*) und Nucleolus (*N*). Der Kernmembran zunächst anliegend ein großer, stark zerlappter Proplastid (*Pp*) mit Primärgranum (*Pgr*), Stromalamellen (*St*) und Vacuolen (*V*). Rechts oben ein junger Plastid mit doppelt konturierter Außenmembran (*Pm*), Peristromium (*Pst*) und Stromalamellen (*St*). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

in den Kern „abgibt". Es müßte näher geprüft werden, ob derartige Vorgänge vielleicht mit einer gesteigerten Stoffwechselleistung der

Siebröhrennachbarzellen im Zusammenhang stehen (vgl. auch die Theorien bei ALTMANN 1949, 1952, 1954; STICH 1951; WOLL 1956 u.a.). Aber auch Artefakte im Nucleolus sind ohne systematische Untersuchung natürlich nicht ohne weiteres auszuschließen.

Sehr wahrscheinlich haben diese in den Nucleolen normaler Zellen nachgewiesenen Strukturen wenig mit den typischen Fibrillenbündeln unserer Siebröhrenkörper gemein. Vorausgesetzt, daß wir letztere überhaupt noch als Nucleolen bezeichnen, muß zumindest zugegeben werden, daß eine weitgehende Veränderung auch der Feinstrukturen stattgefunden hat. Darauf weist in gewissem Sinne bereits ESAU (1947) hin, wenn sie beschreibt, daß unmittelbar mit der Ausstoßung der Kernkörper deren artspezifische Oberflächengestalt entsteht. Unter der Annahme, daß es sich bei den elektronendichten Strukturen in den Nucleolen um körpereigene Substanzen handelt, die eventuell mit der nachgewiesenen RNS identisch sind (CASPERSSON 1950; STICH 1956, s. auch weitere Literatur dortselbst), wäre es immerhin denkbar, daß im Siebröhrenglied derartige Stoffe in einer stoffwechselinaktiven Form gewissermaßen deponiert werden. Hierfür würde die an gewisse Kristallisationsformen erinnernde Art des Feinbaues sprechen (FREY-WYSSLING 1955). In diesem Zusammenhang soll bereits hier erwähnt werden, daß im Cytoplasma ausdifferenzierter Siebröhren niemals eine globuläre Komponente nachgewiesen werden konnte, deren als Meiosomen bezeichnete RNS-Granula in jüngeren Pflanzenzellen u.a. mit dem endoplasmatischen Reticulum in Verbindung stehen sollen (vgl. auch LUND, VATTER und HANSON 1958).

II. Plastiden

Das Plastiden-Problem wurde bereits hinreichend im Zusammenhang mit den lichtmikroskopischen Untersuchungen (KOLLMANN 1960) diskutiert. Letztere hatten sehr eindeutig ergeben, daß diese typischen Siebröhrenbestandteile im wandständigen Protoplasten lokalisiert sind; war ja mitunter der Nachweis des sehr zarten und durchsichtigen Plasmawandbelages überhaupt erst mit der entsprechenden peripheren Lage der stärkeführenden Plastiden in den einzelnen Siebröhrengliedern zu erbringen.

Im Elektronenmikroskop konnte nun gezeigt werden, wie sehr diese zum Teil noch indirekt erbrachten Beweise den Tatsachen entsprachen. Zudem hat gerade die Untersuchung der Siebröhrenplastiden ergeben, daß die Präparations- und Fixierungsmethodik in dieser speziellen Frage optimal sein mußte. Nur in gut fixierten, unverletzten Siebröhrengliedern saßen die 1—2 μ großen, Stärkekörner enthaltenden Plastiden im sehr zarten, nur 0,1—0,3 μ dicken Plasmamantel. Die Güte einer Fixierung wurde hierbei unter anderem auch durch den engen Plasma-Wandkontakt demonstriert.

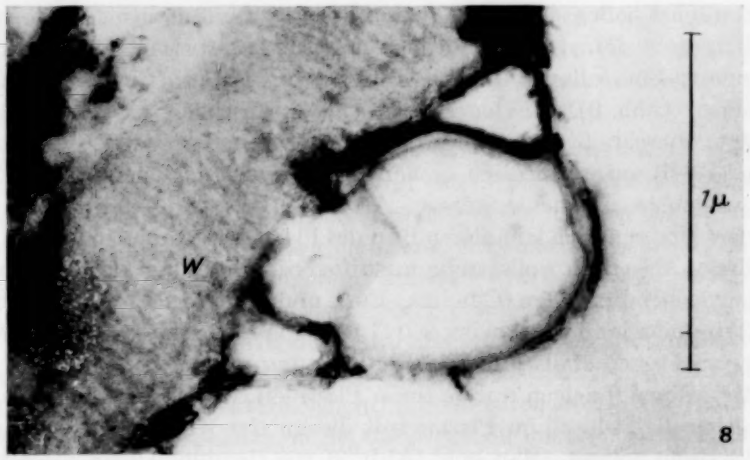
Zunächst ließen die in den meisten bisher untersuchten Siebröhrengliedern gefundenen Plastiden folgendes charakteristisches Bauprinzip erkennen: Eine allseits doppelt konturierte, 100—150 Å dicke äußere Membran (Abb. 9), bei der die einfache osmiophile Schicht 36—45 Å beträgt, umschließt den großen, kontrastarmen Binnenraum mit mehreren (1—6) unterschiedlich großen Stärkekörnern. Einzelne fibrilläre und vesiculäre Elemente können Artefakte sein und stehen vielleicht mit dem ursprünglich lamellären Bau des Plastidenstromas in Beziehung. In diesen sicherlich vollständig ausdifferenzierten Plastiden sind nach lichtoptischen Befunden (CURRIER, ESAU und CHEADLE 1955; MCGIVERN 1957) die einzelnen Stärkekörner frei beweglich. Das elektronenoptische Bild spricht gleichfalls für diese Beobachtung.

Abb. 8 und 9 zeigen nun je einen Plastiden, der wie eine überdimensionale große „Blase" im Plasma mit diesem der Wand des Siebröhrengliedes dicht anliegt. Man sieht (Abb. 8), wie der dünne Protoplast vom Plastiden regelrecht emporgewölbt wird und denselben nur noch mit einer sehr feinen Haut, der Plasmagrenzschicht (Tonoplast), umspannt. Besonders eindrucksvoll tritt diese Plasmahaut auf der Abb. 9 in Erscheinung: als doppelt konturierte Membran (s. Pfeilmarkierung *T*) scheint sie den ganzen Plastiden zu umspannen. — Ich glaube nicht, daß die hierdurch an manchen Stellen (Pfeilmarkierung) deutliche 4fach-Konturierung gemeinsam dem Plastiden angehört, zumal die beiden Doppelmembranen mitunter deutlich getrennt verlaufen. Zudem wurde z. B. an Plastiden, die außerhalb des Plasmas in der Vacuole lagen, stets nur eine einfache Doppelmembran gefunden.

Es wird nun verständlich, warum diese 100—120 Å messende Plasmamembran mit den bisherigen Methoden nicht beobachtet werden konnte, und es erscheint weniger verwunderlich, wenn die großen Plastiden schon bei der geringsten Verletzung die äußerst zarte Plasmahülle „durchbrechen".

Mit ihrem relativ einfachen Feinbau unterscheiden sich die Siebröhrenplastiden erheblich von denen der übrigen Phloemzellen; doch dürfte es sich hierbei wohl nur um verschiedene Differenzierungsstadien handeln. Immerhin konnten in den Siebröhren neben den beschriebenen Formen auch jüngere Plastiden gefunden werden, die noch eine dichte Stromalamellierung zeigten (Abb. 10). (Über die sehr ausführliche Literatur zur Plastidenentwicklung vgl. MÜHLETHALER 1957.) Jüngere Entwicklungsstadien, vor allem aber Proplastiden, wurden in den untersuchten Siebröhrengliedern bei *Passiflora coerulea* bisher nicht beobachtet. Sie sollen deshalb zum Vergleich in den benachbarten Parenchymzellen kurz besprochen werden.

In der Abb. 7 werden unterhalb des Zellkernes mit gut erhaltener Kernmembran 3 Plastiden in verschiedenen Entwicklungsstadien



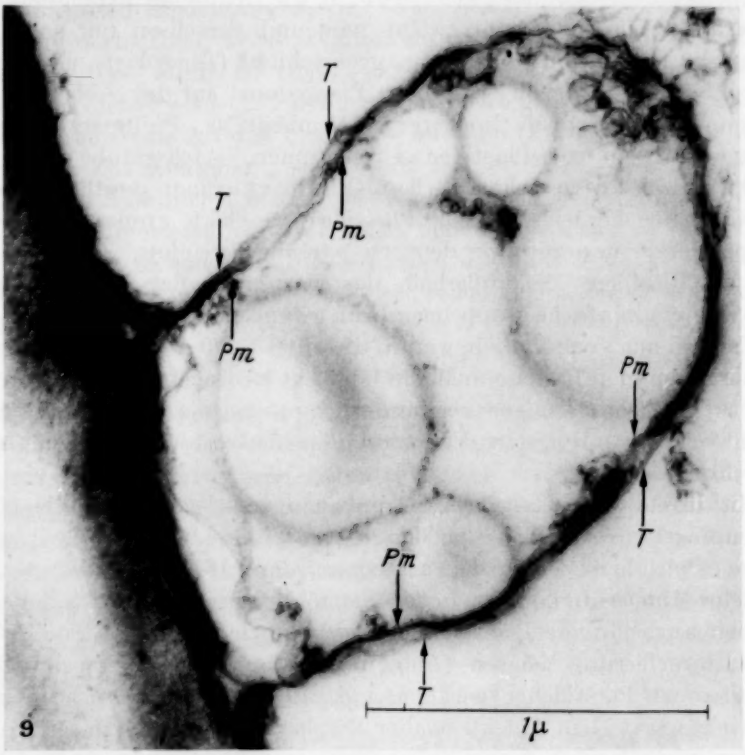


Abb. 8. Ausdifferenzierter Siebröhrenplastid im Wandplasma. *W* die Zellwand. Vgl. mit dem Differenzierungsstadium des Plastiden in Abb. 10. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Abb. 9. Siebröhrenplastid im Wandplasma mit 5 Stärkekörnern. Die doppelt konturierte Plastiden- (*Pm*) und Plasmamembran (*T*) (s. Pfeilmarkierung) ist deutlich. Zu beachten die fein-fädige Struktur des Plasmas oben am Plastiden. Eine Plasmamembran (Tonoplast) an dieser Stelle nicht nachweisbar. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

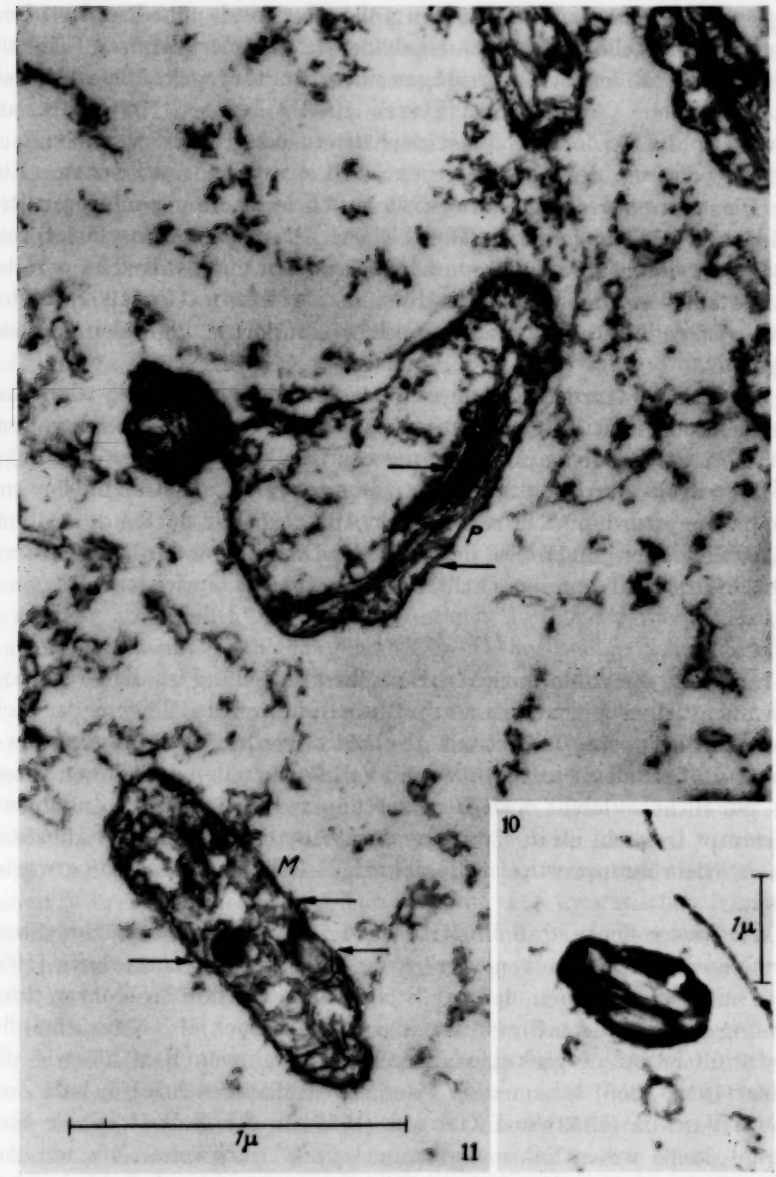


Abb. 10. Jüngerer Plastid — dichte Stromalamellierung — in einer ausdifferenzierten Siebröhre. Vergr. el.-mikr. 5000:1, Endvergr. 15000:1

Abb. 11. Phloemparenchym; junger Plastid (*P*) und Mitochondrium (*M*) mit gut erhaltener Feinstruktur (doppelt konturierte Außenmembran; Plastiden-Stromalamellierung; tubuläre Einstülpungen der inneren Mitochondrienmembran; s. Pfeilmarkierung). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

dargestellt. Bemerkenswert ist der große, stark zerlappte Proplastid mit an mehreren Stellen deutlich ausgebildetem „Primärgranum". Die einzelnen 180 Å großen Elemente zeigen eine mitunter regelmäßige „kristallgitter"-ähnliche Anordnung (HEITZ 1954; LEYON 1954; PERNER 1956a, b). In der oberen Plastidenhälfte sind größere Vacuolen ausgebildet, die von einzelnen Stromalamellen durchzogen werden. Eine den Plastiden begrenzende, doppelt konturierte Membran ist an verschiedenen Stellen deutlich. Der kleinere Plastid (oberer rechter Bildrand) ist weitgehend ausdifferenziert. Vacuolen und zahlreiche parallele Stromalamellen sind vom Peristromium (MÜHLETHALER 1957, s. dort auch weitere Literatur) und doppelt konturierter Plastidenmembran umgeben.

Der Erhaltungszustand junger Plastiden, die bekanntlich als besonders fixierungslabil gelten (STRUGGER 1953; SITTE 1958), ist ein weiterer Beweis für die Brauchbarkeit der angewandten Fixierung. Verquellungen der Feinstrukturen (SITTE 1958), besonders der Stromalamellen und Membranen, wurden nicht beobachtet (Abb. 11). Wir dürfen deshalb mit einiger Sicherheit annehmen, daß auch die Darstellung der labilen älteren Siebröhrenplastiden einem natürlichen Zustand entspricht.

III. Mitochondrien

Innerhalb der umfangreichen Siebröhrenforschung ist die Frage nach dem eventuellen Vorkommen von Mitochondrien im Plasma der Leitbahnen bisher wenig Beachtung geschenkt worden. Dies scheint um so verständlicher, als dieselben, etwa im Vergleich zu den auffälligen Plastiden, gar nicht so leicht einer Beobachtung zugänglich sind. Zudem war überhaupt fraglich, ob in den transparenten, anscheinend sehr substanzarmen Siebröhrenprotoplasten derartige Zellorganellen zu erwarten waren.

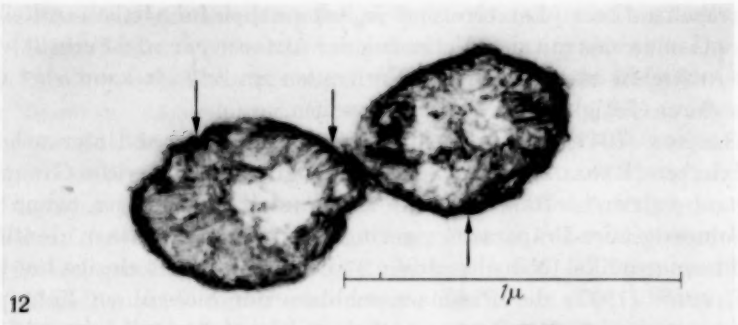
Wir wissen heute, daß die Mitochondrien weitgehend Trägersysteme oxydativer Stoffwechselvorgänge in der Zelle sind. WILLENBRINK (1957) hatte nun zeigen können, daß der Stofftransport in den Siebröhren durch Atmungsgifte zu beeinflussen ist und daß demnach also wahrscheinlich eine ähnliche Abhängigkeit von Atmungsvorgängen besteht, wie dies ARISZ (1952, 1953) für normale Parenchymzellen beschrieben hat. Zwar haben WANNER (1953) und ZIEGLER (1956) in den Zellsäften der Siebröhren „keine wesentlichen Atmungsenzyme" nachweisen können, und die Autoren glauben allein daraus schließen zu können, daß der spezielle Energiebedarf im Phloem von den Siebröhrennachbarzellen, d.h. besonders von den Geleitzellen, übernommen wird (ZIEGLER 1958). Vorausgesetzt, daß wirklich reine Zellsäfte zur Untersuchung gelangten, dürfte der Befund ZIEGLERS, daß auch elektronenoptisch in der Flüssigkeit keine Mitochondrien nachgewiesen werden konnten, keineswegs

überraschend sein. Letztere sind ja bekanntlich Inhaltsbestandteile des Cytoplasmas, das mit den Methoden der Autoren gar nicht erfaßt wurde. Das Auftreten oder Fehlen von Fermenten im Zellsaft kann aber nichts über deren Tätigkeit im Plasma aussagen.

SALMON (1947) beschreibt auf Grund lichtoptischer Untersuchungen in fixierten (REGAUD; HELLY) Siebröhrengliedern zahlreiche Granula als „Mitochondrien". RESCH (1958) äußert sich vorsichtiger, wenn er in Carminessigsäure-Präparaten „geringe Mengen nicht näher identifizierter Plasmapartikel (Mitochondrien ?)" beobachtet. Als einzige hat bisher MCGIVERN (1957) die Plasmaeinschlüsse der Siebröhren lichtoptisch näher untersucht. Mit Recht weist sie wohl auf die unsicheren Angaben bei SALMON hin, wenn sie hervorhebt, daß in fixierten und nachträglich gefärbten Siebelementen im Plasma auch „other granules besides mitochondria were preserved". Da essigsäurehaltige Fixiermittel bekanntlich Mitochondrien zerstören, können auch die Beobachtungen RESCHS nur mit Vorbehalt gewertet werden. Eine Vitalbeobachtung der Mitochondrien mit Janus-Grün nach SOROKIN (1938) gelang MCGIVERN erstmalig sowohl in jungen wie aber auch in alten Siebröhren verschiedener Pflanzenarten. Die 0,8—1 μ großen, rundlichen Organellen werden zwar sehr ausführlich beschrieben, jedoch sind leider die beigefügten Aufnahmen weniger überzeugend. Die methodischen Schwierigkeiten dürften hier allein mit dem Lichtmikroskop erheblich sein.

Unsere nähere Kenntnis vom Feinbau pflanzlicher Mitochondrien verdanken wir der Einführung elektronenmikroskopischer Beobachtungsmethoden, hierbei vor allem der Ultradünnschnittechnik (TURIAN und KELLENBERGER 1956; HEITZ 1957a, b; s. dort auch weitere Literatur; 1959; SITTE 1957, 1958; v. WETTSTEIN 1957). Es hat sich hierbei gezeigt, daß diese pflanzlichen Zellorganellen in ihrem Aufbau prinzipiell denen in tierischen Zellen vergleichbar sind. Die wesentlichen feinstrukturellen Merkmale sind eine doppelt konturierte Außenmembran mit tubuli- oder sacculiartigen Einstülpungen der inneren osmiophilen Schicht in den Binnenraum.

In den Siebröhrengliedern von *Passiflora coerulea* konnte ich nun durch den Einsatz des Elektronenmikroskopes den eindeutigen Nachweis von Mitochondrien erbringen. Diese zeigen klar das obenerwähnte Bauprinzip, ordnen sich somit also ohne weiteres in die Reihe derartiger bekannter Zellorganellen ein. Die kugeligen, mitunter etwas länglich gestreckten, etwa $^1/_2\,\mu$ großen Gebilde sind allseits von einer 145—173 Å dicken, doppelt konturierten Membran umgeben (Abb. 12 und 13), deren innere osmiophile Schicht (45—55 Å) tubuläre Einstülpungen zeigt (Abb. 12 und 13, s. Pfeilmarkierung). Der weitere Binnenraum der Mitochondrien ist häufig stark aufgelockert und substanzarm, doch werden auch Organellen beobachtet, die — meist unter $^1/_2\,\mu$ groß —



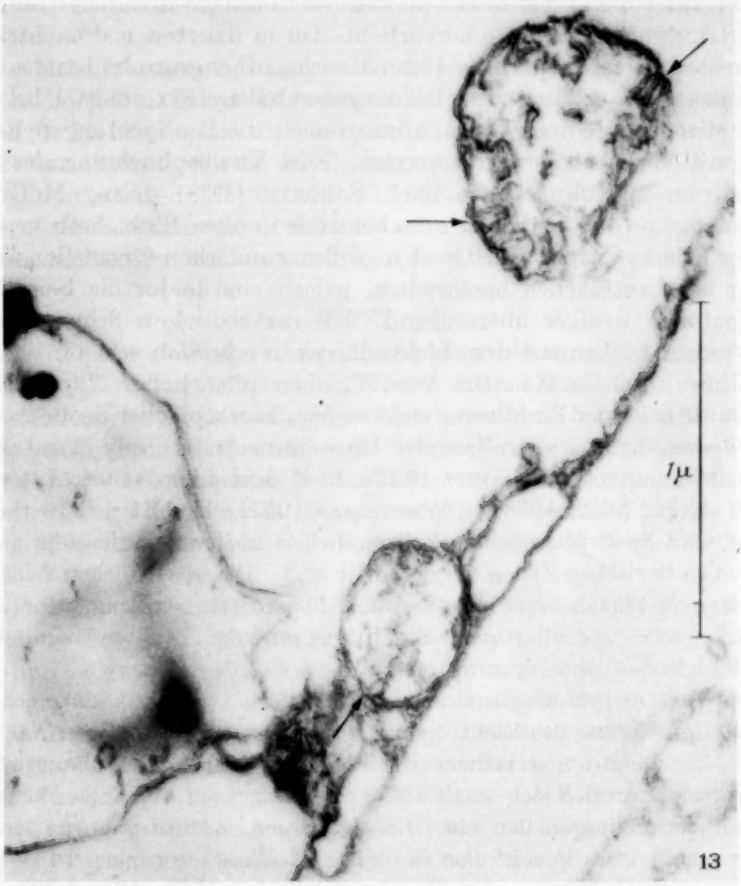


Abb. 12. Siebröhren-Mitochondrien mit charakteristischem Feinbau: Doppelt konturierte Außenmembran und tubuläre Einstülpungen der inneren Grenzschicht (Pfeilmarkierung. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Abb. 13. Zwei Mitochondrien mit stark aufgelockerter Innenstruktur (doppelt konturierte Außenmembran und tubuläre Einstülpungen sichtbar; Pfeilmarkierung). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

eine sehr dichte Innenstruktur zeigen. Dabei füllen anscheinend tubuläre oder membranöse Elemente den Körper weitgehend aus (Abb. 14), wobei Fusionen der einzelnen „Kanäle" häufiger auftreten (Abb. 14).

Abb. 14. Siebröhren-Mitochondrien mit sehr dichter Innenstruktur. Auffällige Fusionen einzelner Strukturelemente (Pfeilmarkierung). Vergr. el.-mikr. 15000:1, Endvergr. 60000:1

Abb. 15. Mitochondrien mit sehr dichter Innenstruktur (vgl. Siebröhren-Mitochondrien auf Abb. 14) in Siebelement-Nachbarzelle. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Letzterer Feinbau weicht allerdings etwas von den bisher von anderen Autoren an pflanzlichen Mitochondrien beschriebenen Strukturen ab, doch wird der vorläufige Befund noch weiterhin geprüft werden müssen.

Wesentlich ist hierbei jedenfalls zu wissen, daß wir sicherlich mit Wechseln und Übergängen zwischen den einzelnen Strukturtypen auch innerhalb der Mitochondrien zu rechnen haben, Vorgänge, die eventuell

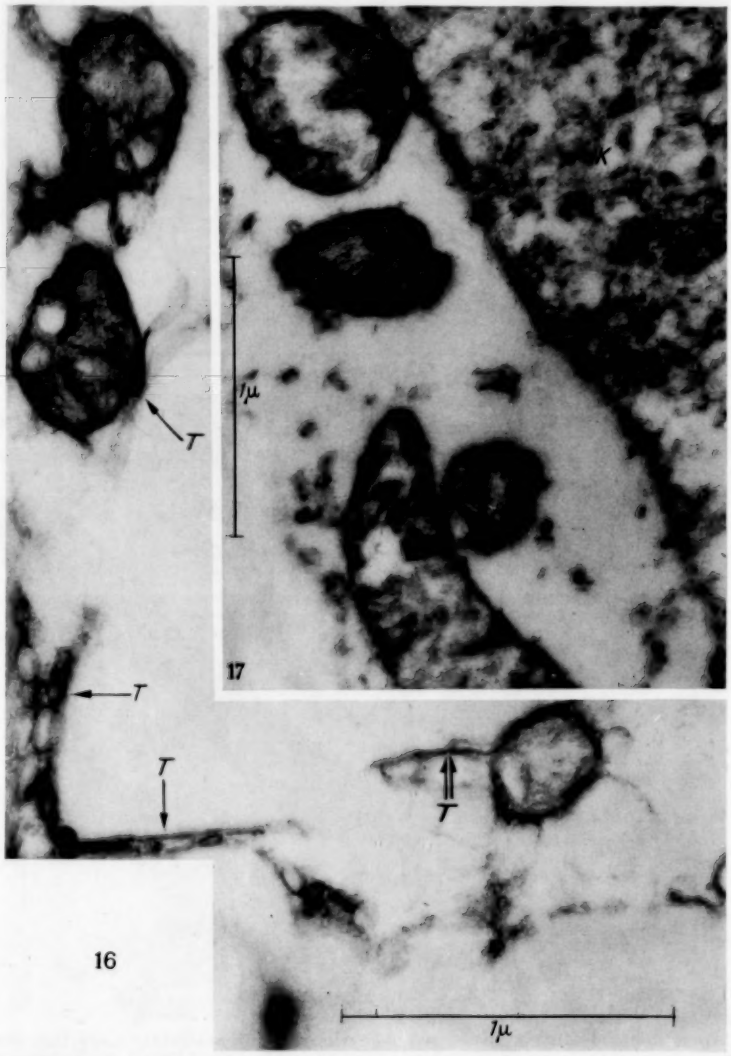


Abb. 16. Drei Mitochondrien mit sehr feiner Innenstruktur („Tubuli" hier als sehr zarte Membranen ausgebildet, vgl. Abb. 17) im wandständigen Siebröhren-Protoplasten. An mehreren Stellen Plasmagrenzschicht gegen die Vacuole [Tonoplast (*T*)] zum Teil als doppelt konturierte Membran (Doppelpfeil) erhalten. Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Abb. 17. Geleitzelle: 4 Mitochondrien mit einer den Siebröhren-Mitochondrien auf Abb. 16 vergleichbaren Innenstruktur. Rechts oben am Bildrand ein Kern (*K*). Vergr. el.-mikr. 10000:1, Endvergr. 40000:1

mit physiologischen Aktivitätsunterschieden innerhalb der Zelle im Zusammenhang stehen (PALADE 1952; DEMPSEY 1956; WEISSENFELS 1957). Allerdings ist noch nicht abzusehen, wieweit auch die Fixierung verändernd wirkt.

Es soll in diesem Zusammenhang nur auf einen sehr eindeutigen Befund hingewiesen werden, der sich mir im Verlaufe meiner Phloemuntersuchungen immer wieder bot: Zwar waren die Mitochondrien in den einzelnen Siebröhrengliedern weniger zahlreich vertreten als z. B. in den Geleitzellen, die häufig von derartigen Zellorganellen geradezu überfüllt erschienen. Doch entsprach der Grad der inneren Auflockerung der einzelnen Siebröhren-Mitochondrien jeweils ausgezeichnet demjenigen in den Nachbarzellen-Mitochondrien[1]. Hierzu vergleiche man die Abb. 14 mit 15 sowie 13 mit 11 und 16 mit 17.

Im Hinblick auf das Stofftransportproblem in den Siebröhren dürfte die Frage nach einer eventuellen physiologischen Einheit von Siebröhrenglied und Geleitzelle (bzw. Nachbarparenchymzelle) höchst interessant sein.

Jedenfalls hat das Studium der Mitochondrien in den Siebröhren und vergleichend in den benachbarten Phloemzellen gezeigt, daß auch der Erhaltungszustand dieser Zellorganellen ein brauchbares Kriterium für die Güte der Gesamtfixierung darstellen kann (vgl. auch PERNER 1958).

Der Nachweis der Mitochondrien im Siebröhrenplasma aber beweist nachdrücklich, daß es sich bei letzterem um ein hochdifferenziertes lebendes Gebilde handelt und von einem „prämortalen Zustand" (HUBER und ROUSCHAL 1938; HUBER 1941) keine Rede sein kann.

F. Das Grundplasma

Unter dem Begriff Grundplasma sollen hier nach der Definition von SITTE (1958) diejenigen Cytoplasmastrukturen in den Siebröhren behandelt werden, die nur im elektronenmikroskopischen Bereich einer Beobachtung zugänglich sind.

Auf die besonderen Schwierigkeiten, denen im vorliegenden Fall bei der Beurteilung von Feinstrukturen des Cytoplasmas ausdifferenzierter Siebröhren zu begegnen war, wurde im vorstehenden bereits hingewiesen. Dennoch glaube ich, daß zumindest dort den vorgefundenen Cytoplasmastrukturen eine gewisse Realität zukommt, wo auch der Erhaltungs-

[1] Bei dem beschränkten, zur Verfügung stehenden Bildausschnitt im Elektronenmikroskop war eine eindeutige Unterscheidung zwischen Geleitzellen und Phloemparenchymzellen nicht immer möglich. Beide Zelltypen verfügen über gleiche Inhaltsbestandteile (vgl. auch ESAU 1934). Deshalb habe ich in unsicheren Fällen lieber allgemein von Nachbarzellen gesprochen. Im übrigen sollte die Bedeutung der Geleitzellen vielleicht auch nicht überschätzt werden, da immerhin eindeutige Angaben vorliegen, nach denen nicht nur bei Gymnospermen geleitzellenfreie Siebröhren vorkommen (ESAU 1943; CHEADLE und ESAU 1958).

zustand verschiedener bekannter Zellorganellen und des Nachbarzellencytoplasmas eine gelungene Fixierung erwarten läßt.

Der 0,1—0,3 μ dicke, Plastiden und Mitochondrien bergende Plasmawandbelag zeigt in der Regel eine stark aufgelockerte Anordnung seiner einzelnen Strukturelemente. Charakteristisch ist eine Vielzahl sehr kleiner Bläschen neben größeren Vacuolen (Abb. 2 und 16), die von dichteren Plasmamembranen gebildet werden.

Nur vereinzelt konnten bisher höher geordnete Membransysteme im Siebröhrenplasma nachgewiesen werden (SCHUMACHER und KOLLMANN 1959), die z. B. als „Golgi-Körper" in normalen meristematischen und ausdifferenzierten Pflanzenzellen bereits vielfach von anderen Autoren beschrieben wurden (PERNER 1958, vgl. auch die dort angeführte Literatur).

Neben diesen in ihrer Gesamtheit als vesiculäre und membranöse Elemente zu bezeichnenden Cytoplasmastrukturen (sie sind den von LUND, VATTER und HANSON 1958 in ausdifferenzierten Mais-Wurzelzellen beschriebenen Plasmastrukturen durchaus vergleichbar) werden nun in den Siebelementen von *Passiflora coerulea* regelmäßig fein-„fädige Elemente" im Wandplasma beobachtet (Abb. 18). Die einzelnen 70—130 Å breiten, unterschiedlich langen „Plasmafäden" zeigen mitunter eine deutlich parallele Ausrichtung mehrerer längsgestreckter Elemente (Abb. 18). Diese Cytoplasmakomponente scheint charakteristisch für alle bisher untersuchten Siebröhrenglieder zu sein und findet nichts Vergleichbares in anderen ausdifferenzierten Phloemzellen. Über ihre natürliche Anordnung in der lebenden Zelle kann noch nichts ausgesagt werden, zumal die labilen Strukturen anscheinend besonders leicht durch Wundeinfluß oder dergleichen hervorgerufenen Veränderungen unterliegen.

So habe ich schon bei meinen lichtoptischen Untersuchungen zeigen können (KOLLMANN 1960), daß bei wenig schonender Behandlung des Siebröhrenprotoplasten als Artefakte sog. „Schleimkörper" auftreten. Diese — wahrscheinlich mitunter die bekannten „Schlauchköpfe" bildende — „schleimige" Substanz habe ich in schlecht fixierten Siebröhren wiederholt elektronenoptisch untersuchen können, wobei festgestellt wurde, daß sie sich gleichfalls aus diesen, allerdings dann völlig ungeordneten und dicht gepackten, „fädigen Elementen" aufbaute, demnach also plasmatischer Natur sein muß.

Dagegen erweckten bei gutem Erhaltungszustand des Siebröhrenplasmas gewonnene Bilder (Abb. 18 und 19) nicht selten den Eindruck, als ob an bestimmten Plasmapartien, besonders im Bereich der Siebporen, diese „Plasmafäden" in sehr feiner Verteilung meist als längsgestreckte und parallel ausgerichtete Strukturelemente auch in die Vacuole des Siebröhrengliedes hineinführen (Abb. 19).

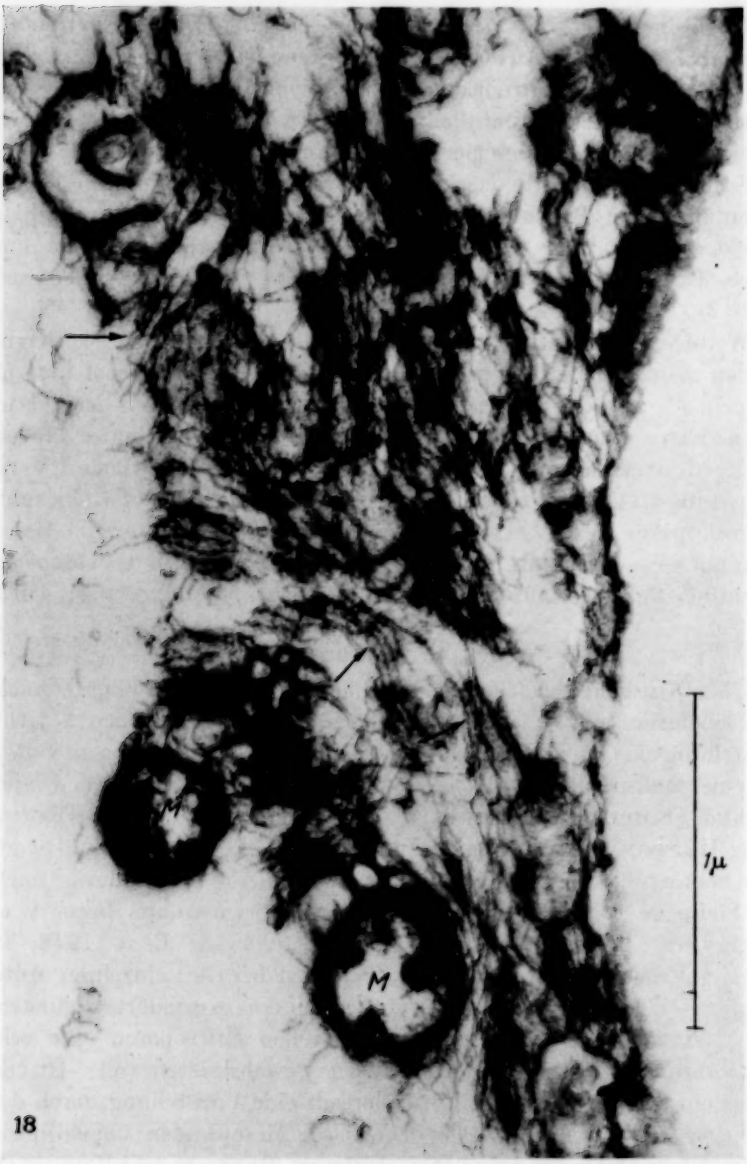


Abb. 18. Die „fädigen Elemente" im Mitochondrien (*M*) bergenden Siebröhren-Wandplasma zeigen mitunter eine parallel gestreckte Ausrichtung (Pfeilmarkierung). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Bezeichnend ist, daß in derartigen Bereichen des Siebelementprotoplasten niemals der übliche Tonoplast sichtbar war, der sonst als deutliche Plasmagrenzschicht (Abb. 16) gegenüber dem Zellsaftraum mehrfach nachgewiesen werden konnte.

Möglicherweise sind die hier beschriebenen „fädigen Elemente" nur sichtbar gewordener Ausdruck des ungemein substanzarmen und lockeren Baues des Siebröhrenplasmas; vielleicht aber spannen sie sich tatsächlich als äußerst feine Plasmafäden an manchen Stellen durch die Vacuole aus. Daß es sich hierbei um Vacuoleninhalt im Sinne von Zellsaftcoagulaten handelt, dagegen spricht das klare Vorkommen im organellenführenden Plasmawandbelag, ferner die beobachtete längsgestreckte Ausrichtung der Einzelelemente und schließlich die andersartige Darstellung von Zellsaftmaterial in Nachbarparenchymzellen (Abb. 2).

Weitere Untersuchungen, vor allem mit verschiedenen Fixiermitteln, werden zeigen müssen, welche Anordnung der hier zunächst als „fädige Elemente" zu beschreibenden Struktur wirklich eigen ist. Darüber hinaus kann eine Beziehung zu Plasmastrukturen bekannter Natur nur dann gedeutet werden, wenn es gelingt, diese offensichtlichen Veränderungen im Cytoplasma sich differenzierender Siebröhren auch sublichtmikroskopisch lückenlos zu beschreiben. Nach den bisherigen Befunden kann nur gesagt werden, daß hier ein erster Einblick in das sicher außerordentlich substanzarme besondere Siebröhrenplasma erlangt wurde.

G. Siebporen

Über Natur und Aufbau der Verbindungsbrücken zweier benachbarter Siebelementprotoplasten in den Siebporen bestehen heute 2 Grundvorstellungen. Die eine wird von den Siebröhren-Forschern vertreten, die eine massive Plasmanatur der Siebporenfüllungen als erwiesen betrachten (Kuhla 1900; Schmidt 1917; Crafts 1939a, 1948; Rouschal 1941; Hepton, Preston und Ripley 1955; Preston 1958). Ihr gegenüber behauptet sich noch immer die alte Hillsche Vorstellung, nach der die Siebpore von einer schleimerfüllten Plasmaröhre besetzt werde (Hill 1908; Mühldorf 1937; Schneider 1945; Esau 1948, 1950). Gewisse Varianten erfahren diese Theorien bei den einzelnen Autoren. So nimmt Crafts (1948) rein hypothetisch eine gesonderte Feinstruktur der Plasmabrücken an, die mit eventuellen Mikroporen eine erhöhte Permeabilität für einen Lösungsstrom gewährleisten soll. Rouschal (1941) entwickelte ebenfalls hypothetisch eine Vorstellung, nach der die Siebpore nur aus einer den permeablen Mesoplasten umschließenden Plasmalemmaröhre bestehen soll. Hepton, Preston und Ripley (1955) sowie Preston (1958) glauben die massiven Plasmaverbindungsbrücken mit elektronenoptischen Abbildungen belegen zu können, doch wird mit Recht der Einwand von Esau, Currier und Cheadle (1957) erhoben, daß eine klare Unterscheidung zwischen Plasma und „Schleim" auf ihren Bildern zumindest fragwürdig ist. In der Tat läßt vor allem die Aufnahme von Preston (1958) jegliche Feinstrukturen in den

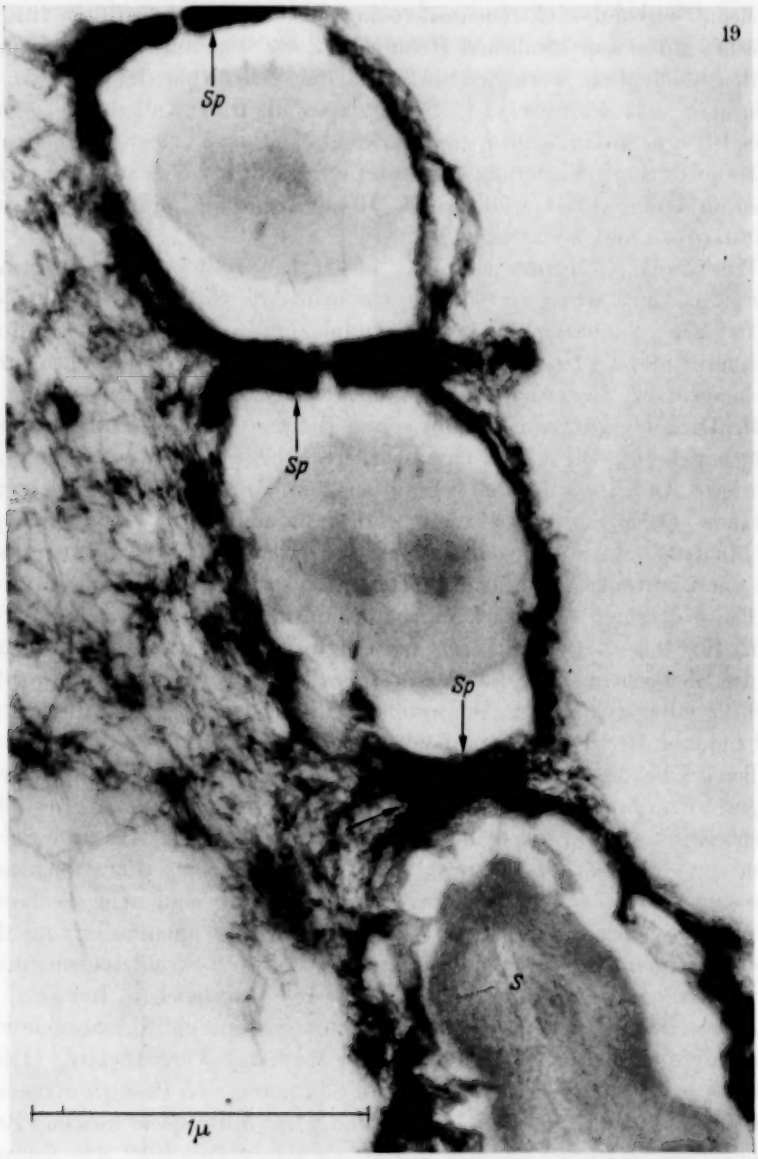


Abb. 19. Siebplatte (*S*) mit drei längs geschnittenen Plasmabrücken (*Sp*), von denen nur die untere gut erhalten ist und eine durchgehende Verbindung „fädiger Elemente" (Pfeilmarkierung) des Wandplasmas und der Vacuole zweier benachbarter Siebelemente erkennen läßt. Vergr. el-mikr. 12000:1, Endvergr. 48000:1

Siebporenfüllungen von *Vitis* vermissen, so daß ein Beweis für ihre Plasmanatur keineswegs erbracht ist.

Meine eigenen elektronenmikroskopischen Untersuchungen führten zunächst zu einem ähnlichen Resultat: Zwar war auf den gut kontrastierten, sicherlich verhältnismäßig dicken Schnitten der Aufbau der Siebplatte aus Primärwand, Sekundärwand und Kalloseauflagerung (Abb. 19) gut zu erkennen, doch waren die Poren selbst bei der noch relativ schlechten Fixierung von einer stark osmiophilen undurchstrahlbaren Substanz dicht erfüllt (Abb. 19 zwei obere Siebporen; vgl. auch SCHUMACHER und KOLLMANN 1959).

Vereinzelte „Dünnstellen" im elektronendichten Strang konnten gleichfalls keine weiteren Aufschlüsse bringen. Sicher schien nur, daß die fragliche Substanz mit dem Wandplasma zumindest in räumlicher Beziehung stand. Im entwässerten Präparat sind die Siebplattendurchbrechungen bei *Passiflora coerulea* vor der Kalloseeinlagerung etwa 1 μ weit[1]. Dies stimmt mit lichtoptischen Befunden an Lebendpräparaten weitgehend überein, so daß eine stärkere Schrumpfung kaum anzunehmen ist. Der Unterschied gegenüber den Befunden von ESAU und CHEADLE (1959) bei einer nicht näher bezeichneten *Passiflora spec.* (4,6 μ!) mag artspezifisch sein. Der später aufgesetzte Kallosemantel läßt einen mitunter nur 0,2 μ weiten, jedoch durchgehenden Kanal für die Plasmaverbindungsbrücken frei. Membranverschlüsse, wie sie VOLZ (1952) für 0,5—2 μ enge Poren bei Angiospermen beschreibt, konnten auf den Siebröhrenwänden von *Passiflora* bisher nicht gefunden werden. Auch die obenerwähnten „Dünnstellen" in der osmiophilen Füllsubstanz sind anderer Herkunft; hierauf wird noch eingegangen werden.

Bereits bei der Besprechung der Cytoplasmastrukturen wurde darauf hingewiesen, daß charakteristische „fädige Elemente" häufig im Siebporenbereich zu erkennen sind. Die Abb. 19 zeigt, wie derartige Strukturen von beiden benachbarten Siebröhrengliedern in die gemeinsame Pore einmünden, wobei die untere Siebpore auch eindeutig die Kontinuität einer Plasmafadenstruktur zeigt. Diese geht unmittelbar aus dem wandständigen Protoplasten und gleichen „fädigen Strukturelementen", die möglicherweise auch teilweise die Vacuole durchziehen, hervor.

An besonders dünnen Schnitten durch vor allem gut fixiertes Gewebe ist es mir nun vereinzelt gelungen, bei stärkster Vergrößerung (12000 bis 15000 × E.M.) die Feinstruktur der Siebporen von *Passiflora coerulea* noch weiter aufzulösen. Die Abb. 20 und 21 sind Beispiele hierfür: Zahlreiche „Plasmafäden" durchziehen zu vielen „gebündelt" die Siebpore auf ihrer gesamten Länge von einem Siebröhrenglied in das anschließende. Die einzelnen 100—150 Å starken „Fäden" entsprechen eventuell sehr feinen „Röhren-" oder „Doppelmembran-Elementen" mit jeweils einer 35—55 Å messenden osmiophilen äußeren Membran und einer weniger

[1] Bei den vorliegenden Größenangaben sind natürlich Schrumpfungen von Plasma und Zellwandmaterial zu berücksichtigen (STRUGGER 1957); deshalb sind nur ungefähre Werte sinnvoll.

elektronendichten Binnenschicht (s. Pfeilmarkierung auf Abb. 20, 21 und Abb. 20a). — In der durch Überzeichnung der Abb. 20 gewonnenen

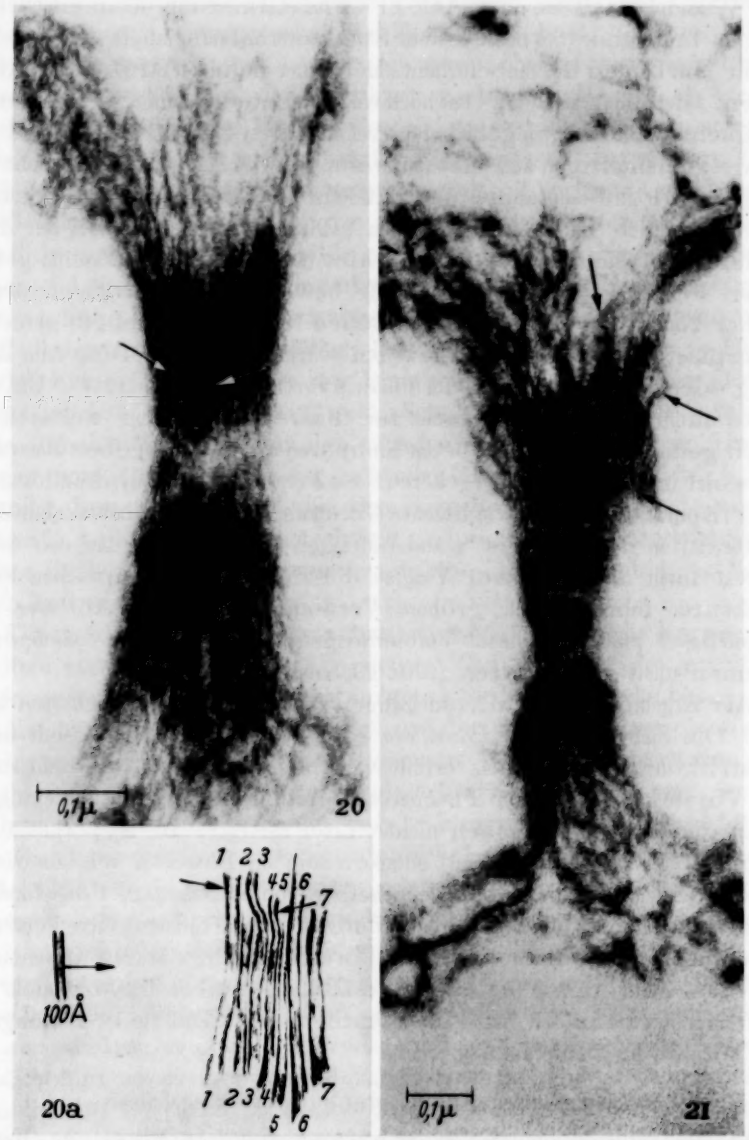


Abb. 20 u. 21. Feinstruktur der plasmatischen Verbindungsbrücken in den Siebplatten (Siebelement-Querwände im Längsschnitt). Abb. 20. Die Siebpore wird in Längsrichtung vollständig von Plasmafäden durchzogen, die an manchen Stellen (Pfeilmarkierung) „Röhren"- oder „Doppelmembran"-Struktur vermuten lassen. Die durch Überzeichnen der Abb. 20 erhaltene Abb. 20a zeigt 7 Plasmafäden in der Mitte der Siebpore, die eine eventuelle Röhrenstruktur andeuten. Vergr. el.-mikr. 15000:1, Endvergr. 120000:1. Abb. 21. Übergang der Siebporen-Feinstruktur in vergleichbare Strukturelemente des Wandplasmas (Pfeilmarkierung; unterer Pfeil: Röhrenstruktur einer Fibrille). Vergr. el.-mikr. 12000:1, Endvergr. 96000:1

Abb. 20a sind sieben derartige „Fadenelemente" abgebildet. — Der unmittelbare Übergang in die beschriebenen (70—130 Å) „fädigen Elemente" des Wandplasmas ist auf Abb. 21 (Pfeilmarkierung) klar ersichtlich, und es liegt nahe, daß bei besserer Strukturerhaltung auch die „Plasmafäden" im Lumen der Siebelemente sich einer gleichen Struktur zuordnen lassen. Hier müssen jedoch erst noch weitere Untersuchungen, vor allem an Querschnittsbildern, zu genaueren Aufschlüssen führen. Bisher sind mir derartige Aufnahmen aus methodischen Schwierigkeiten noch nicht gelungen. Wir müssen annehmen, daß die beschriebenen Feinstrukturen außerordentlich labil sind. PERNER (1958) weist bereits bei der Darstellung von Plasmodesmen darauf hin, daß die im Mesoplasma gefundenen Feinstrukturen — „osmiophile bzw. uranophile Elemente nematischer Natur"! — sich einem „optischen Nachweis entziehen, wenn der Protoplast schlecht fixiert ist bzw. bei stärkerer Schrumpfung eine Dehnung oder gar ein Zerreißen der Plasmaverbindungen eintritt". Um wie vieles mehr mag diese Tatsache für die verhältnismäßig weiten Siebporen gelten? Die beiden oberen Siebporen auf Abb. 19 geben Beispiele, die wohl in diese Richtung gehören. So könnten z. B. Wundeinflüsse bei der Präparation oder eine schlechte Fixierung und die damit verbundene Kontraktion des ehemals wandständigen Protoplasten in den Siebröhren nicht nur zu einem Verlust der sublichtmikroskopischen Feinstrukturen führen, auch gröbere Veränderungen, z. B. Abreißen der ehemaligen plasmatischen Verbindungsbrücken in den Siebporen, scheinen nicht gerade selten (Abb. 19, obere 2 Siebporen).

Als Ergebnis dieser Untersuchungen darf jedenfalls festgehalten werden: Die Siebporen von *Passiflora coerulea* sind vollständig mit einer feinstrukturierten Substanz erfüllt, die plasmatischer Natur sein muß. Die Vorstellung von einer Plasmaröhre mit andersartiger „schleimiger" Substanzfüllung ist demnach nicht weiter haltbar. Die hypothetischen Mikroporen von CRAFTS sind ebensowenig zu beweisen wie zu widerlegen, desgleichen die Mesoplasmatheorie von ROUSCHAL, doch fordern die hier neu nachgewiesenen hochdifferenzierten Feinstrukturen der einzelnen osmiophilen Elemente in den Poren nunmehr stärkere Beachtung. Welche Bedeutung sie für unsere Vorstellungen über die Mechanik des Stofftransportes haben, muß die Zukunft zeigen. Daß sie bedeutungslos sein sollten, ist kaum anzunehmen.

Zusammenfassende Besprechung der Ergebnisse[1]

In der vorliegenden sowie der vorangegangenen Mitteilung (KOLLMANN 1960) wurde versucht, eine möglichst eingehende Beschreibung des Siebröhrenplasmas von *Passiflora coerulea* zu geben, weil dieses Objekt besonders günstig erschien. Es hatte sich dabei gezeigt, daß die Unter-

[1] Einschließlich der lichtoptischen Befunde (KOLLMANN 1960).

suchung weitgehend ausdifferenzierter und somit potentiell funktionstüchtiger Siebröhren prinzipiell möglich ist. Damit dürfte vor allem den von CRAFTS wiederholt erhobenen Einwänden gegen die Ergebnisse früherer Autoren begegnet sein. Mit ESAU (1947, 1950), CURRIER, ESAU und CHEADLE (1955) u.a. konnte ich einen charakteristischen kugelförmigen Einschluß in den kernlosen Siebröhrengliedern als freien Nucleolus identifizieren. Der Beweis, daß letzterer aus dem Kern stammt und bei dessen Degeneration übrigbleibt, konnte geführt werden. Dennoch ist die Bezeichnung Kernkörperchen nur mit Vorbehalt angebracht, da die feinstrukturelle Analyse die grundsätzliche Sonderstellung dieser den Siebelementen eigenen Gebilde gegenüber normalen Nucleolen pflanzlicher (und tierischer) Zellkerne aufzeigen konnte. Eine weitere eingehende Untersuchung dieses Strukturwechsels ist erforderlich, bevor eine eventuelle Bedeutung für die Siebröhren herausgestellt werden kann. — Die an gewisse Kristallisationsformen der Viren erinnernde Feinstruktur (FREY-WYSSLING 1955) mag „zufällig" sein. SCHRAMM u. Mitarb. (1955) fanden beim Tabakmosaikvirus für das einzelne Virusteilchen einen Durchmesser von 150 Å, worin der zentrale RNS-Achsenfaden 34 Å einnimmt. Bei der Einzelfibrille des Siebröhrennucleolus mit seinem 115×175 Å Durchmesser umschließt wahrscheinlich eine elektronendichte Hülle (RNS ?) einen weniger dichten, sicherlich nicht RNS-haltigen Zentralbereich.

Für meine weiteren Untersuchungen war der fragliche Körper nur insofern von Interesse, als er ein sicheres Kriterium für den jeweiligen Differenzierungszustand des beobachteten Siebröhrengliedes bot.

Nun hatte sich allerdings gezeigt, daß der Siebröhrenprotoplast auch nach der Kerndegeneration noch gewissen Wechseln unterworfen sein muß. — ROUSCHAL (1941) hatte plasmatische Veränderungen in den Siebröhren von *Robinia* bereits vor der Kernauflösung beobachtet. — Bei *Passiflora coerulea* waren mitunter Siebelemente mit freiem Nucleolus zu beobachten, die noch über einen relativ dichten, Plastiden bergenden Plasmawandbelag und erst schwach ausgebildete Siebplatten verfügten. Sie unterschieden sich somit von älteren Zellgliedern, deren äußerst zarter Protoplast nur noch indirekt aus der Lokalisation der Plastiden oder bei Plasmolyseexperimenten zu erschließen war. Es ist hier schwer zu entscheiden, welchem Differenzierungsstadium die nachgewiesenen sublichtmikroskopischen Veränderungen des Siebröhrencytoplasmas im Hinblick auf ihre Transportfunktion genau zuzuordnen sind. Sicherlich werden wir mit fortschreitendem Alter mit einem allmählichen Wechsel feinstruktureller Cytoplasmaanteile zu rechnen haben. Daß derartige Veränderungen in den Siebröhren zusätzlich eigene Wege gehen, war bereits auf Grund lichtoptischer Untersuchungen zu erwarten (ESAU 1950; CRAFTS 1951). Die elektronenmikroskopische Analyse hat hier

zeigen können, daß schließlich eine Auflockerung und sehr feine Verteilung einzelner Strukturelemente des Siebröhrenplasmas erfolgt, wobei jedoch die offensichtliche Labilität der Strukturen gegenüber Präparations- und vor allem Fixierungsmethoden noch keine endgültigen Aussagen über die natürliche Anordnung innerhalb des funktionstüchtigen Siebröhrengliedes zuläßt. Sicherlich ist das Cytoplasma der Siebröhren weitgehend hydratisiert und wahrscheinlich teilweise nur noch von einem Gerüst feiner „fädiger Elemente" gehalten. Wasserverschiebungen im Sinne einer reversiblen Sol-Gel-Transformation (vgl. FREY-WYSSLING 1955), verbunden mit Strukturwechseln der einzelnen Cytoplasmakomponenten (WOHLFARTH-BOTTERMANN 1959), wären durchaus denkbar. Das vergleichende Studium von „aktiven Siebröhren" und „Ruhephloem" kann hier vielleicht zu weiteren Einsichten führen. Die nur im Winter durchzuführenden Siebplattenplasmolysen fordern im Zusammenhang mit einer nachweislich unterschiedlichen Plasmaviscosität auch eine Veränderung im Bereich cytoplasmatischer Feinstrukturen. Untersuchungen hierüber sind im Gange.

Bei den lichtmikroskopischen Untersuchungen konnte wiederholt gezeigt werden, daß mit zunehmender Plasmaschädigung innerhalb der Vacuole sog. „Schleimtropfen" auftraten, die sich zum bekannten „Schlauchkopf" formierten. Später hat sich dann herausgestellt, daß dieser Siebröhren„schleim" aus denselben „fädigen Elementen" aufgebaut wird, wie wir sie auch im Wandplasma und bei guter Erhaltung in feinerer Verteilung im Bereich der Zentralvacuole antreffen. Es zeigte sich weiterhin, daß auch die Feinstrukturen in den Siebporen vergleichbaren Elementen zuzuordnen sind. Der Begriff „Schleim" war bisher in der üblichen Siebröhrenterminologie zu verstehen (vgl. auch ESAU 1947, 1950). Er hat mit den bekannten Pflanzenschleimen (MÜHLETHALER 1950; FREY-WYSSLING 1959) nichts gemein, wie die Untersuchungen im Elektronenmikroskop ergeben haben. Für reine Zellsaftkoagulationen wird man die fragliche Substanz kaum halten können, wie der Feinbau der Siebporenfüllungen ebenso wie die Anordnung im Wandplasma zeigt. Eine derartige Cytoplasmakomponente ist bisher nicht beschrieben, im Hinblick auf die Sonderstellung der Siebröhren aber durchaus möglich und interessant. Bei den „Schlauchköpfen" in den verletzten Siebelementen dürfte demnach eine pathologische Zusammenballung feiner plasmatischer Elemente vor den Siebplatten vorliegen. Ebenso ließen sich die vielfach beobachteten zentralen und peripheren Plasma- bzw. „Schleim"stränge (CRAFTS 1932, 1933, 1939b; ABBE und CRAFTS 1939; A. SCHUMACHER 1948; CURRIER, ESAU und CHEADLE 1955) mit einer artefiziellen Vernetzung und somit Vergröberung sublichtmikroskopischer Strukturen erklären.

Bei einer Reihe von Pflanzen, die bisher zu Phloemstudien herangezogen wurden, gilt die Bildung wohldefinierter „Schleimkörper" („slime bodies": Esau 1947, 1953 u. a.) als erstes sicheres Kennzeichen der Siebröhrenspezialisierung gegenüber den Nachbarzellen schon bald nach der Teilung der Phloemmutterzelle (Esau 1938). Diese Gebilde „dispergieren" später bei der weiteren Zelldifferenzierung zugleich mit dem degenerierenden Kern im Zellsaft (Crafts 1933, 1934, 1939a; Esau 1938, 1939, 1947, 1948, 1950). Bei einigen Leguminosen bleibt ein „eiweißreicher Körper" in den ausdifferenzierten Siebröhrengliedern erhalten (Strasburger 1887, 1891; Resch 1954) und wird erst in alten Siebröhren mit starken Kallosepolstern auf den Siebplatten gelöst (Strasburger 1891). Eine elektronenmikroskopische Untersuchung dieser Körper könnte hier vielleicht weitere Einblicke in die protoplasmatische Spezialisierung der Phloemzellen ermöglichen (Esau 1947). Zum Vergleich dürften plasmatische Untersuchungen an Pflanzen von Interesse sein, in deren Siebröhren bisher kein „Schleim" nachgewiesen werden konnte (Esau, Cheadle und Gifford 1953).

Die Feinstruktur innerhalb der Siebporen konnte erstmalig nachgewiesen werden. Gerade hier haben die Untersuchungen ergeben, daß die aufgefundenen Feinstrukturen plasmatischer Natur sein müssen. Perner (1958) beschreibt in den Plasmodesmen von Angiospermen-Wurzelmeristemzellen „osmiophile bzw. uranophile Elemente nematischer Natur", die eine Verbindung des Mesoplasmas zweier benachbarter Zellen gewährleisten sollen. Bei dem hier zur Diskussion stehenden Stofftransportproblem wäre es natürlich äußerst interessant zu wissen, wieweit die bei den Siebröhren aufgefundenen Strukturelemente mit denen der Plasmodesmen vergleichbar sind. Auf die Labilität derartiger Feinstrukturen wurde im Zusammenhang mit den meist beobachteten stark osmiophilen Plasmaverbindungsbrücken (Hepton, Preston und Ripley 1955; Preston 1958) hingewiesen. Sicherlich sind alle bisher veröffentlichten strukturlosen und stark elektronenstreuenden Porenfüllungen Artefakte und den von Hill sowie Crafts und Esau wiederholt beschriebenen, stark färbbaren „slime-strings" vergleichbar.

Wie sehr die Entwicklung der Siebröhren ihre eigenen Wege geht, hat neben den plasmatischen Veränderungen auch der Plastidenbau gezeigt. Das Differenzierungsstadium der Siebröhrenplastiden darf, mit Ausnahme einzelner jüngerer Plastiden, sicherlich als irreversibel angesehen werden. Da die einzelnen Stärkekörnchen nur noch von einer einfachen Plastidenmembran umgeben sind, der ganze Plastid selbst aber gleichfalls nur von einer sehr zarten Plasmamembran gehalten wird, nimmt es nicht weiter wunder, wenn mit den herkömmlichen Präparationsmethoden Plastiden sowie freie Stärkekörner hauptsächlich in der Vacuole beobachtet wurden (Crafts 1933, 1951; Esau 1939 u. a.). Die Angabe

von ROUSCHAL (1941), daß die Stärkekörner *auf* der Innenseite des Plasmamantels sitzen und in die Vacuole hineinreichen, entspricht auch meinen Beobachtungen. Allerdings konnte ROUSCHAL damals nicht sehen, daß die Plastiden doch noch von einer feinen Plasmamembran umgeben werden. Das von ihm unter dem Lichtmikroskop demonstrierte Massenstromexperiment dürfte jedoch wenig beweisend sein. Ein einseitiger Glycerinsog muß zu einer Zerstörung von Plasma- bzw. Plastidenmembran geführt und somit den Stärkekörnchen einen freien Fluß zum Osmotikum ermöglicht haben. Bei meinen Plasmolyseexperimenten war ich oft genug Zeuge solcher Verletzungseffekte. ROUSCHAL hätte sich wahrscheinlich durch anschließende Plasmolyse- und Deplasmolyseversuche vom Zustand des so traktierten Protoplasten überzeugen können. Die Beobachtungen von SCHUMACHER (1939) sowie CURRIER, ESAU und CHEADLE (1955) dürften gleichfalls in diese Richtung gehören.

Die Untersuchungen WILLENBRINKS (1957) hatten nun ergeben, daß die einen Stofftransport beeinflussenden Gifte vornehmlich die Enzyme des Atmungsstoffwechsels angreifen müssen. Somit war eindeutig bewiesen, daß eine Störung des Energiehaushalts der Leitgewebe von nachhaltiger Wirkung auf das Transportgeschehen in der Pflanze sein muß. Die Frage nach der genauen Lokalisation derartiger Enzymsysteme war aber aus seinen Versuchen noch nicht zu entnehmen. Hier konnten Geleit- und Phloemparenchymzellen ebensogut wie die Siebelemente selbst beteiligt sein. Eine Vielzahl der Autoren neigt heute ohne zwingenden Grund dazu, die Hauptaktivität beim Transportmechanismus tatsächlich in die den Siebröhren benachbarten Zellen zu verlegen, während den Leitelementen selbst eine mehr passive Rolle beim Stofftransport zukommen soll. Diese Vermutungen scheinen eine Stütze im offensichtlich sehr früh eintretenden Wechsel protoplasmatischer Enzymsysteme der sich spezialisierenden Siebröhren zu finden. Als Beispiel hierfür wird die sich mit Jod weinrot färbende Siebröhrenstärke (ESAU 1950), die Unfähigkeit, Neutralrot zu speichern (ROUSCHAL 1941) und Tetrazoliumsalze zu reduzieren (BAUER 1953; CURRIER, ESAU und CHEADLE 1955), angeführt. WANNER (1952, 1953) vermutet gar, daß der Siebelementprotoplast die meisten seiner Enzyme im Verlaufe der Ausdifferenzierung einbüßt und deshalb zu keinen eigenen Stoffwechselleistungen mehr befähigt sei. Letztere, vor allem der Analyse von „Siebröhrensäften" zugrunde liegenden Behauptungen wurden durch gleichartige Befunde ZIEGLERS (1956, 1958) gestützt.

Der eindeutige Nachweis von Mitochondrien im Cytoplasma ausdifferenzierter und somit sicher funktionstüchtiger Siebelemente mahnt nun aber im Sinne CURRIERS, ESAUS und CHEADLES (1955) doch zu gewisser Zurückhaltung bei den obenerwähnten Schlußfolgerungen. Zwar konnte gezeigt werden, daß die Siebröhrenglieder über eine

geringere Anzahl von Mitochondrien verfügen, im Vergleich zum reichlichen Vorkommen derartiger Zellorganellen in den benachbarten Phloemzellen, so daß mit einer unterschiedlichen Bedeutung und Funktion der einzelnen Zellen in dem andererseits sicherlich als Einheit zu wertenden Gewebe gerechnet werden darf. Die aufgezeigte Strukturhomologie von Siebröhren- und Nachbarzellen-Mitochondrien wirft ebenfalls die Frage nach einer eventuellen physiologischen Einheit des Leitgewebes auf. Sie muß im Zusammenhang mit dem Stofftransportproblem natürlich erst weiter geprüft werden. Es darf gleichfalls nicht unberücksichtigt bleiben, daß bereits die Aufrechterhaltung der im Siebröhrenplasma beschriebenen Feinstrukturen und der Semipermeabilität des Protoplasten ebenso wie die Produktion und Resorption von Kallosematerial eines sicherlich nicht unbeträchtlichen Aufwandes an Stoffwechselenergie bedarf. Daß derartige Leistungen wohl nicht *nur* von den Geleitzellen und Phloemparenchymzellen aufgebracht werden, beweist zumindest das Vorkommen von normal gebauten Mitochondrien in den Siebröhren.

Abschließend seien die mitgeteilten Beobachtungen der von MÜNCH (1930) vorgeschlagenen Massenstromtheorie gegenübergestellt: Da eine offene Vacuolenverbindung der einzelnen Siebröhrenglieder, wie sie von MÜNCH angenommen wurde, nachweislich nicht existiert, bleibt nur die Möglichkeit, eine gesteigerte Permeabilität in den Siebporen anzunehmen. Hierbei ist jedoch kaum einzusehen, wie diese feinstrukturierten Plasmaverbindungsbrücken nur als passive Filter für einen durch sie hindurchgehenden Lösungsstrom dienen sollen. Sie müßten, wie die hier erstmalig nachgewiesene Feinstruktur zeigt, demselben einen immerhin nicht unbeträchtlichen Widerstand entgegensetzen. Für eine Strömung des Siebporeninhaltes selbst liegen bisher keine Anhaltspunkte vor, und gegen eine nur sekundäre Füllung der Poren beim Anschneiden der Siebelemente (MÜNCH 1942) spricht der hochdifferenzierte Feinbau.

Eine wesentliche Stütze schien die Massenstromtheorie in letzter Zeit aber durch die eindrucksvollen Experimente MITTLERS und seiner Mitarbeiter gefunden zu haben (KENNEDY und MITTLER 1953; MITTLER 1953, 1957, 1958; ZIEGLER und MITTLER 1959). Es hatte sich gezeigt, daß aus isolierten, siebröhrenpunktierenden Blattlausrüsseln längere Zeit ein „reiner" Siebröhrensaft auszutreten vermag. Diese Befunde wurden durch vergleichende Beobachtungen von MOTHES und ENGELBRECHT (1957) sowie vor alllem von WEATHERLEY, PEEL und HILL (1959) gestützt. Letztere Autoren konnten indessen zeigen, daß die Siebröhrensaftsekretion mit gewissen Turgor-Mechanismen im gesamten Leitgewebe in unmittelbarem Zusammenhang steht. Unter der Annahme, daß dieser Saftaustritt einem normalen Stofftransport in der Pflanze entspricht, sollte man ja zunächst annehmen, daß derselbe nur bei ungehindertem gleichzeitigem Durchströmen einer Vielzahl von hintereinanderliegenden

Siebröhrengliedern verständlich wird. Nun lassen aber gerade die Untersuchungen von WEATHERLEY, PEEL und HILL (1959) an Stammsegmenten und isolierten Rindenstreifen erkennen, daß im Siebröhrensystem offenbar verschiedene Wege der Stoffleitung beschritten werden können und Zucker- sowie Wassertransport zwar in gewisser Abhängigkeit voneinander, doch immerhin eindeutig getrennt erfolgen kann. Der Wasserstrom verläuft nämlich in diesen Versuchen offenbar keineswegs longitudinal, sondern kommt auch seitlich von dem umliegenden Parenchym. Wieweit also diese Versuche einen normalen Längstransport beweisen können, ist sehr fraglich. Im Vergleich zu den sonst üblichen Safthautschnitten bei der Siebröhrensaftgewinnung ist der Einstich eines Blattlausrüssels zwar sicherlich die schonendere Methode. Dennoch ist nicht sicher, ob der „mikrochirurgische" Eingriff nicht doch gewisse Veränderungen im Bereich der Siebporen und an anderen Stellen zur Folge hat und eben nicht typisch für den normalen Stofftransport in den Siebröhren ist. Vielleicht handelt es sich mehr um eine Art von Blutungsphänomen, das nicht notwendig mit dem normalen Transport zusammenzuhängen braucht. Jedenfalls ist es schwer zu verstehen, wie die vorstehend beschriebenen plasmatischen Feinstrukturen für längere Zeit bei einer Massenströmung, wie sie beim Anstich der Blattlausrüssel zweifellos erfolgt, aufrechterhalten bleiben können.

Dem Problem des natürlichen Stofftransportes in den Siebröhren wird uns daher sicherlich erst eine Vielzahl weiterer Einzelbeobachtungen der verschiedensten Arbeitsrichtungen näherbringen. Nur eine davon ist die Untersuchung der Siebröhrenprotoplasmatik; aber gerade hier gilt es, noch eine Reihe von Fragen weiter zu klären, von denen bereits einige im vorstehenden aufgezeigt werden konnten. Weitere Untersuchungen werden in Zukunft zeigen müssen, wieweit die besondere Feinstruktur des Siebröhrenplasmas einer speziellen Funktion entspricht. Die vorliegenden ersten Ergebnisse können tatsächlich nur Anregungen in dieser Richtung geben. So sollte vor allem den jetzt nachgewiesenen, für Siebelemente charakteristischen „fädigen Elementen" des Cytoplasmas weitere Beachtung geschenkt werden. Es wäre durchaus denkbar, daß diese vielleicht als besondere Differenzierungen cytoplasmatischer Grenzschichten zu wertenden Strukturen ihre Aufgabe im Sinne einer Adsorption oder Spreitung der zu transportierenden Moleküle fänden (vgl. VAN DEN HONERT 1932), wobei eine Veränderung und Bewegung derartiger sublichtmikroskopischer Strukturen zu diskutieren wäre (BENNET 1956). Ob den plasmatischen Verbindungsbrücken in den Siebplatten hierbei eine gesonderte Aufgabe zukommt (SPANNER 1958), muß natürlich gleichfalls erst geprüft werden. Eine eventuelle Bedeutung mag dieser Frage in letzter Zeit durch die Beobachtungen von ESAU und CHEADLE (1955) sowie CHEADLE und ESAU (1958) zukommen. Demnach

scheint bei einer Reihe von Pflanzen im Verlaufe ihrer Ontogenese eine gewisse Tendenz zu bestehen, durch Unterteilung der Cambiummutterzellen eine vermehrte Anzahl von Siebplatten auszubilden. Aus den Untersuchungen der Autoren (ESAU u. CHEADLE 1959) geht weiter hervor, daß auch die phylogenetische Entwicklung zu einer Vergrößerung der plasmatischen Verbindungsbrücken in den Siebplatten führt.

Sollte dieser Entwicklungsgang allgemeine Gültigkeit besitzen, so wäre er sicherlich wenig verständlich, wenn hiermit nicht gleichzeitig eine spezielle Aufgabe gelöst würde. Zumindest fällt es schwer, die Siebelementquerwände nur als Hindernis für einen Stofftransport anzusehen.

Zusammenfassung

Ausgehend von lichtmikroskopischen Beobachtungen ausdifferenzierter, lebender Siebelemente von *Passiflora coerulea* (KOLLMANN 1960) gelingt mit Hilfe eines sog. „Zielpräparationsverfahrens" auch die elektronenmikroskopische Untersuchung ausgewählter Siebröhrenglieder.

Ein bei der Kerndegeneration übrigbleibender freier Nucleolus zeigt das jeweilige Differenzierungsstadium der untersuchten Siebelemente an.

Eine auffällige Feinstruktur dieses ehemaligen Kernkörperchens konnte im Elektronenmikroskop nachgewiesen werden: Eine Vielzahl von über 5000 Å langen, gestreckten Grundfibrillen mit einem jeweiligen Durchmesser von 115×175 Å baut in dicht hexagonaler Packung den 2×3 μ großen Nucleolus auf. Mit diesem Feinbau unterscheidet sich der „Siebröhren-Nucleolus" grundsätzlich von „echten Kernkörpern" normaler Zellen.

Die elektronenoptischen Untersuchungen bestätigen die zum Teil indirekt gewonnenen Befunde lichtoptischer Beobachtungen.

Die einzelnen Siebröhrenglieder werden von einem nur 0,1—0,3 μ dicken, stark aufgelockerten Plasmawandbelag ausgekleidet. Eine doppelt konturierte, 100—120 Å messende Grenzschicht gegenüber dem umfangreichen Zellsaftraum konnte an mehreren Stellen nachgewiesen werden.

Darüber hinaus wird die Vacuole selbst wahrscheinlich von einer Vielzahl sublichtmikroskopischer „Plasmafäden" — Durchmesser: 70 bis 130 Å — durchsetzt. Diese stehen besonders im Bereich der Siebporen in direkter Verbindung mit gleichen Strukturelementen des Wandplasmas. Der Tonoplast ist an derartigen Stellen nicht nachweisbar.

Es wird vermutet, daß diese feinen „Plasmafäden", über deren natürliche Anordnung im lebenden, funktionstüchtigen Siebröhrenglied noch nichts Endgültiges ausgesagt werden kann, sich bei unzureichender Fixierung zu den bekannten lichtmikroskopisch sichtbaren Plasma- bzw. „Schleim"strängen oder gar zum „Schlauchkopf" vor den Siebplatten zusammenlagern.

Die plasmatischen Verbindungsbrücken zweier benachbarter Siebelementprotoplasten in den Siebporen bestehen aus durchgehenden 100—150 Å starken „Plasmafäden", die eventuell „Röhren"- oder „Doppelmembran"-Struktur (äußere bzw. einfache osmiophile Schicht 36—55 Å) besitzen. Ein Zusammenhang mit den „fädigen Elementen" der Vacuole und des Plasmawandbelages ist wahrscheinlich.

Als echte Plasmaeinschlüsse ausdifferenzierter Siebröhren werden elektronenoptisch Plastiden und Mitochondrien nachgewiesen.

Mit ihrem recht einfachen Bauprinzip — eine doppelt konturierte äußere Membran (100—150 Å) umschließt den großen strukturlosen Binnenraum mit zahlreichen, wahrscheinlich frei beweglichen Stärkekörnern — konnte die Eigenart der sicherlich ausdifferenzierten Siebröhrenplastiden vor allem gegenüber jüngeren Entwicklungsstadien in benachbarten Phloemzellen herausgestellt werden.

Die Mitochondrien unterscheiden sich allgemein nur in ihrer geringeren Anzahl und mitunter auch geringeren Größe von gleichen Organellen in den Nachbarzellen. Entgegen den Beobachtungen an Plastiden konnte auf die Strukturhomologie der Siebröhren- und übrigen Phloemzellen-Mitochondrien hingewiesen werden.

Der Nachweis eines hoch differenzierten Siebröhrenplasmas läßt gewisse Vorstellungen, nach denen den Siebelementen beim Stofftransport nur eine passive Rolle zukommen soll, zumindest sehr fragwürdig erscheinen.

Literatur

ABBE, L. B., and A. S. CRAFTS: Phloem of white pine and other coniferous species. Bot. Gaz. **100**, 695—722 (1939). — ALTMANN, H. W.: Über die Abgabe von Kernstoffen in das Protoplasma der menschlichen Leberzelle. Z. Naturforsch. **4b**, 138—144 (1949). — Der Funktionswechsel des Zellkerns im exokrinen Pankreasgewebe. Naturwiss. **39**, 138—139 (1952). — Zur Morphologie der Wechselwirkung von Kern und Cytoplasma. Verh. Ges. dtsch. Naturf. u. Ärzte, 1954. — ARISZ, W. H.: Transport of organic compounds. Ann. Rev. Plant Physiol. **3**, 109—130 (1952). — Absorption and transport by the tentacles of *Drosera capensis*. V. Influence on the transport of substances inhibiting enzymatic processes. Acta bot. néerl. **2**, 74—106 (1953). — BACHMANN, L., u. P. SITTE: Dickenbestimmung nach TOLANSKY an Ultradünnschnitten. Mikroskopie **13**, 289—304 (1959). — BAUER, L.: Zur Frage der Stoffbewegungen in der Pflanze mit besonderer Berücksichtigung der Wanderung von Fluorochromen. Planta (Berl.) **42**, 367—451 (1953). — BENNET, H. S.: The concepts of membrane flow and membrane vesiculation as mechanism for active transport and ion pumping. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 99—103 (1956). — BERNHARD, W., F. HAGUENAU et CH. OBERLING: L'ultrastructure du nucléole de quelques cellules animales, révélée par la microscope électronique. Experientia (Basel) **8**, 58—59 (1952). — BOPP-HASSENKAMP, G.: Untersuchungen über die submikroskopische Fibrillenstruktur von Kern und Nucleolen. Z. Naturforsch. **14b**, 188—194 (1959). — CASPERSSON, T.: Cell growth and function. Norton, New York 1950. — CHEADLE, V. J., and K. ESAU: Secondary phloem of Callicanthaceae. Univ. Calif. Publ. Bot. **29**, 397 ff. (1958). — CRAFTS, A. S.: Phloem anatomy, exudation and transport of organic nutrients in cucurbits.

Plant Physiol. **7**, 183—225 (1932). — Sieve tubes structure and translocation in the potato. Plant Physiol. **8**, 81—104 (1933). — Phloem anatomy in two species of *Nicotiana*, with notes on the interspecific graft union. Bot. Gaz. **95**, 592—608 (1934). — The relation between structure and function of the phloem. Amer. J. Bot. **26**, 172—177 (1939a). — The protoplasmatic properties of sieve tubes. Protoplasma **33**, 389—398 (1939b). — Movement of materials in phloem as influenced by the porous nature of the tissue. In interaction of water and porous materials. Faraday Soc. Dic. No **3**, 153—159 (1948). — Movement of assimilates, viruses, growth-regulators, and chemical indicators in plants. Bot. Rev. **17**, 203—284 (1951). — Currier, H. B., K. Esau and V. J. Cheadle: Plasmolytic studies of phloem. Amer. J. Bot. **42**, 68—81 (1955). — Dempsey, E. W.: Variations in the structure of mitochondria. J. biophys. biochem. Cytol. **2**, Suppl., 305—312 (1956). — Esau, K.: Ontogeny of phloem in sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Amer. J. Bot. **21**, 632—644 (1934). — Ontogeny and structure of the phloem of tobacco. Hilgardia **11**, 343—424 (1938). — Development and structure of phloem tissue. Bot. Rev. **5**, 373—432 (1939). — Ontogeny of the vascular bundle in *Zea Mays*. Hilgardia **15**, 327—368 (1943). — A study of some sieve tube inclusions. Amer. J. Bot. **34**, 224—233 (1947). — Phloem structure in the grapevine and its seasonal changes. Hilgardia **18**, 217—296 (1948). — Development and structure of the phloem tissue. II. Bot. Rev. **16**, 67—114 (1950). — Plant anatomy. New York: John Wiley & Sons, Inc. 1953. — Esau, K., and V. J. Cheadle: Significance of cell divisions in differentiating secondary phloem. Acta bot. néerl. **4**, 348—357 (1955). — Size of pores and their contents in sieve elements of Dicotyledons. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) **45**, 156—162 (1959). — Esau, K., V. J. Cheadle and E. M. Gifford: Comparative structure and possible trends of specialization of the phloem. Amer. J. Bot. **40**, 9—19 (1953). — Esau, K., H. B. Currier and V. J. Cheadle: Physiology of phloem. Ann. Rev. Plant Physiol. **8**, 349—374 (1957). — Frey-Wyssling, A.: Die submikroskopische Struktur des Cytoplasmas. In L. V. Heilbrunn u. F. Weber, Protoplasmatologia, Bd. II, Teil A 2. Wien: Springer 1955. — Die pflanzliche Zellwand. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959. — Heitz, E.: Kristallgitterstruktur des Granum junger Chloroplasten von *Chlorophytum*. Exp. Cell Res. **7**, 606—608 (1954). — Die Struktur der Chondriosomen und Plastiden im Wurzelmeristem von *Zea Mays* und *Vicia faba*. Z. Naturforsch. **12**b, 283—286 (1957a). — Die strukturellen Beziehungen zwischen pflanzlichen und tierischen Chondriosomen. Z. Naturforsch. **12**b, 576—578 (1957b). — Über die Chondriosomen-Struktur sowie das Vorkommen plasmatischer Lamellensysteme bei *Coprinus disseminatus*. Z. Naturforsch. **14**b, 179—180 (1959). — Hepton, C. E. L., R. D. Preston and G. W. Ripley: Electron microscopic observations on the structure of the sieve plates in *Cucurbita*. Nature (Lond.) **176**, 868—870 (1955). — Hill, A. W.: The histology of the sieve tubes of Angiosperms. Ann. Bot. **22**, 245—290 (1908). — Hodge, A. J., E. M. Martin and R. K. Morton: The structure of some cytoplasmic components of plant cells in relation to the biochemical properties of isolated particles. J. biophys. biochem. Cytol. **3**, 61—70 (1957). — Horstmann, E.: Zur Elektronenmikroskopie des Nukleolus und Karyoplasmas. Verh. dtsch. Ges. Path. 1958, 361—365. — Horstmann, E., u. A. Knoop: Zur Struktur des Nukleolus und des Kerns. Z. Zellforsch. **46**, 100—107 (1957). — Huber, B.: Gesichertes und Problematisches in der Wanderung der Assimilate. Ber. dtsch. bot. Ges. **59**, 181—194 (1941). — Huber, B., u. E. Rouschal: Anatomische und zellphysiologische Beobachtungen am Siebröhrensystem der Bäume. Ber. dtsch. bot. Ges. **56**, 380—391 (1938). — Kennedy, J. S., and T. E. Mittler: A method of obtaining phloem sap via the mouth parts of aphids. Nature (Lond.) **171**, 528 (1953). — Kollmann, R.: Untersuchungen über das Protoplasma der Siebröhren von

Passiflora coerulea. Planta (Berl.) **54**, 611—640 (1960). — KUHLA, F.: Die Plasmaverbindungen bei *Viscum album*. Mit Berücksichtigung des Siebröhrensystems von *Cucurbita Pepo*. Bot. Z. **58**, 29—58 (1900). — LEYON, H.: The structure of chloroplasts VI.: The origin of the chloroplast laminae. Exp. Cell Res. **7**, 609—611 (1954). — LUND, H. A., A. E. VATTER and J. B. HANSON: Biochemical and cytological changes accompanying growth and differentiation in the roots of *Zea Mays*. J. biophys. biochem. Cytol. **4**, 87—98 (1958). — MCGIVERN, M. J.: Mitochondria and plastids in sieve-tube cells. Amer. J. Bot. **44**, 37—48 (1957). — MEYER, A.: Das Chlorophyllkorn in chemischer, morphologischer und biologischer Beziehung. Leipzig 1883. — MITTLER, T. E.: Amino-acids in phloem sap and their exretion by aphids. Nature (Lond.) **172**, 207 (1953). — Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) I. The uptake of phloem sap. J. exp. Biol. **34**, 334—341 (1957). — Studies on the feeding and nutrition of *Tuberolachnus salignus* (Gmelin) II. The nitrogen and sugar composition of ingested phloem sap and excreted honey dew. J. exp. Biol. **35**, 74—84 (1958). — MOTHES, K., u. L. ENGELBRECHT: Über Blatthonigtau. Flora (Jena) **145**, 133—145 (1957). — MÜHLDORF, A.: Das plasmatische Wesen der pflanzlichen Zellbrücken. Beih. bot. Zbl. **56**, 171—364 (1937). — MÜHLETHALER, K.: The structure of plant slimes. Exp. Cell Res. **1**, 341—350 (1950). — Der gegenwärtige Stand der elektronenmikroskopischen Erforschung der Pflanzenzelle. Naturwiss. **44**, 204—213 (1957). — MÜNCH, E.: Die Stoffbewegung in der Pflanze. Jena 1930. — Durchlässigkeit der Siebröhren für Druckströmungen. Flora (Jena) **136**, 223—262 (1942). — PALADE, G. E.: The fine structure of mitochondria. Anat. Rec. **114**, 427—452 (1952). — PERNER, E. S.: Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. Z. Naturforsch. **11b**, 560—566 (1956a). — Die ontogenetische Entwicklung der Chloroplasten von *Chlorophytum comosum*. Z. Naturforsch. **11b**, 567—573 (1956b). Elektronenmikroskopische Untersuchungen zur Cytomorphologie des sogen. „Golgisystems" in Wurzelzellen verschiedener Angiospermen. Protoplasma **49**, 407—446 (1958). — PRESTON, R. D.: The ascent of sap and the movement of soluble carbohydrates in stems of higher plants. 10th Sympos. of the Colston Res. Soc. (Bristol) 24.—27. 3. 58; pp. 366—384. London: Butterworth's Scientific Publications. — RESCH, A.: Beiträge zur Cytologie des Phloems. (Entwicklungsgeschichte der Siebröhrenglieder und Geleitzellen bei *Vicia faba*.) Planta (Berl.) **44**, 75—98 (1954). — Weitere Untersuchungen über das Phloem von *Vicia faba*. Planta (Berl.) **52**, 121—143 (1958). — ROUSCHAL, E.: Untersuchungen über die Protoplasmatik und Funktion der Siebröhren. Flora (Jena) **135**, 135—200 (1941). — SALMON, J.: Differenciation des tubes criblés chez les Angiospermes: Recherches cytologiques. Imprimé Oberthur, Rennes, Mai 1947. — SCHMIDT, E. W.: Bau und Funktion der Siebröhren der Angiospermen. Jena 1917. — SCHNEIDER, H.: The anatomy of peach and cherry phloem. Bull. Torrey bot. Club **72**, 137—158 (1945). — SCHRAMM, G., G. SCHUMACHER u. W. ZILLIG: Die Struktur des Tabakmosaikvirus, III. Mitt. Der Zerfall in alkalischer Lösung. Z. Naturforsch. **10b**, 481—492 (1955). — SCHRAMM, G., u. W. ZILLIG: Die Struktur des Tabakmosaikvirus. IV. Mitt. Die Reaggregation des nukleinsäure-freien Proteins. Z. Naturforsch. **10b**, 493—499 (1955). — SCHUMACHER, A.: Beitrag zur Kenntnis des Stofftransportes in dem Siebröhrensystem höherer Pflanzen. Planta (Berl.) **35**, 642—700 (1948). — SCHUMACHER, W.: Über die Plasmolysierbarkeit der Siebröhren. Jb. wiss. Bot. **88**, 545—553 (1939). — SCHUMACHER, W., u. R. KOLLMANN: Zur Anatomie des Siebröhrenplasmas bei *Passiflora coerulea*. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 176—179 (1959). — SITTE, P.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen an meristematischen Pflanzenzellen. Experientia (Basel) **13**, 419—420 (1957). — Die Ultrastruktur der Wurzelmeristemzellen der Erbse. *(Pisum sativum.)* Protoplasma **49**, 447—522

(1958). — Sorokin, H. P.: Mitochondria and plastids in living cells of *Allium cepa*. Amer. J. Bot. **25**, 28—33 (1938). — Spanner, D. C.: The translocation of sugar in sieve tubes. J. exp. Bot. **9**, 332—342 (1958). — Stich, H.: Experimentelle karyologische und cytochemische Untersuchungen an *Acetabularia mediterranea*. Z. Naturforsch. **6b**, 319—326 (1951). — Bau und Funktion der Nukleolen. Experientia (Basel) **12**, 7—14 (1956). — Strasburger, E.: Botanisches Praktikum, 2. Aufl. Jena 1887. — Über den Bau und die Verrichtungen der Leitungsbahnen in den Pflanzen. Histol. Beitr., Bd. 3, Jena 1891. — Strugger, S.: Über die Struktur der Proplastiden. Ber. dtsch. bot. Ges. **66**, 439—453 (1953). — Elektronenmikroskopische Beobachtungen an den Plasmodesmen des Urmeristems der Wurzelspitze von *Allium cepa*; ein Beitrag zur Kritik der Fixation und Beurteilung elektronenmikroskopischer Größenangaben. Protoplasma **46**, 365—367 (1957). — Strugger, S., u. H. Lindner: Untersuchungen zum Problem der Feinstruktur des Cytoplasmas der Wurzelmeristemzelle von *Allium cepa*. Protoplasma **50**, 607—626 (1959). — Turian, G., et E. Kellenberger: Ultrastructure du corps paranucléaire, des mitochondries et de la membrane nucléaire des gamètes d'*Allomyces macrogynus*. Exp. Cell Res. **11**, 417—422 (1956). — Van den Honert, T. H.: On the mechanism of transport of organic materials in plants. Proc. kon. ned. Akad. Wet. **35**, 1104—1111 (1932). — Volz, G.: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Porengröße pflanzlicher Zellwände. Mikroskopie **7**, 251—266 (1952). — Wanner, H.: Phosphataseverteilung und Kohlenhydrattransport in der Pflanze. Planta (Berl.) **41**, 190—194 (1952). — Die Enzyme der Glykolyse im Phloemsaft. Ber. schweiz. bot. Ges. **63**, 201—212 (1953). — Weatherley, P. E., A. J. Peel and G. P. Hill: The physiology of the sieve tube. Preliminary experiments using aphid mouth parts. J. exp. Bot. **10**, 1—16 (1959). — Weissenfels, N.: Über die funktionelle Entleerung, den Feinbau und die Entwicklung von Tumor-Mitochondrien. Z. Naturforsch. **12b**, 168—171 (1957). — Wettstein, D. v.: Chlorophyll-Letale und der submikroskopische Formwechsel der Plastiden. Exp. Cell Res. **12**, 427—506 (1957). — Willenbrink, J.: Über die Hemmung des Stofftransportes in den Siebröhren durch lokale Inaktivierung verschiedener Atmungsenzyme. Planta (Berl.) **48**, 269—342 (1957). — Wohlfarth-Bottermann, K. E.: Die Kontrastierung tierischer Zellen und Gewebe im Rahmen ihrer elektronenmikroskopischen Untersuchung an ultradünnen Schnitten. Naturwiss. **44**, 287—288 (1957). — Gestattet das elektronenmikroskopische Bild Aussagen zur Dynamik in der Zelle? Z. Zellforsch. **50**, 1—27 (1959). — Woll, E.: Zur Abgabe von Nukleolusstoffen an das Cytoplasma. Planta (Berl.) **47**, 299—302 (1956). — Ziegler, H.: Untersuchungen über die Leitung und Sekretion der Assimilate. Planta (Berl.) **47**, 447—500 (1956). — Über die Atmung und den Stofftransport in den isolierten Leitbündeln der Blattstiele von *Heracleum Mantegazzianum*. Planta (Berl.) **51**, 186—200 (1958). — Ziegler, H., u. T. E. Mittler: Über den Zuckergehalt der Siebröhren- bzw. Siebzellensäfte von *Heracleum Mantegazzianum* und *Picea Abies*. Z. Naturforsch. **14b**, 278—281 (1959).

Dr. Rainer Kollmann,
Botanisches Institut der Universität Bonn a. Rh, Meckenheimer Allee 170

Planta 55, 108—111 (1960)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Montpellier

BEOBACHTUNGEN ÜBER DIE RESISTENZ VON ZELLEN VERSCHIEDENER STELLUNG, NEBST BEMERKUNGEN ÜBER AKINETEN

Von

HERMANN B. LÜCK

Mit 3 Textabbildungen

(Eingegangen am 23. März 1960)

Bei entwicklungsmechanischen Untersuchungen über das Wachstum von Rotalgen starben in einer Versuchsserie mit Thallusfragmenten von *Griffithia setacea* C. AG. (syn. *Griffithia flosculosa* BATT.) viele Zellen. Da die Lage dieser toten Zellen in den Fragmenten nicht zufallsbedingt ist, teilen wir die Befunde über eine unterschiedliche Resistenz von Zellen verschiedener Stellung mit, auch wenn die Ursachen für die Schädigungen nicht näher bekanntgeworden sind.

Zu Versuchsbeginn (am 22. August) wurden Thallusspitzen so von der restlichen Pflanze abgetrennt, daß unterhalb derjenigen Zellen, die Seitenfilamente tragen, noch zwei weitere vorhanden waren. Nach der Isolierung wurden die Fragmente einzeln in kleine Röhrchen übertragen. Die autoklavierte Nährlösung bestand aus Seewasser, das 25 ml/Liter des Filtrates einer Erdabkochung, 100 mg/Liter $NaNO_3$ und 20 mg/Liter Na_2HPO_4 enthielt. Wenn es in dem Folgenden nicht anders angegeben ist, wurden die Wahrscheinlichkeiten von systematischen Differenzen durch Vergleiche mit der Normalabweichung und der t-Verteilung errechnet. Diesen Arbeitsgängen liegen selbstverständlich keine Relativzahlen, sondern die Originalwerte zugrunde.

In der Abb. 1 ist die relative Sterbehäufigkeit der Zellen oberhalb einer Verzweigungsstelle dargestellt. Die Scheitelzelle wurde mit der Positionsnummer 1 bezeichnet, die folgenden Zellen mit den Nrn. 2, 3, 4 usw. Es fällt auf, daß die Scheitelzellen gegen Schädigungen sehr viel unempfindlicher sind als die Zellen mit den höheren Positionsnummern. Ihre Sterberate beträgt mit etwa 12% toter Zellen nur ein Drittel der durchschnittlich 36% in den übrigen Positionen. Im einzelnen ist der Unterschied zwischen den Frequenzen der abgestorbenen Scheitelzellen und der Zellen in der Position 2 mit $P = 0{,}02—0{,}01$ statistisch gesichert.

Mit Ausnahme der letzten Zelle des Fragmentes entspricht die Sterberate der Seitenfilamente tragenden und der ihr in basaler Richtung benachbarten Zelle dem durchschnittlichen Wert von 36%. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Häufigkeiten toter Zellen ober- und unterhalb der Verzweigungen des Fadens besteht nicht ($P = 0{,}90—0{,}80$).

Die Endzellen von Fragmenten, die, auch im vorliegenden Versuch, entweder sich selbst durch Auswachsen am äußeren Ende zu Rhizoiden

umwandeln oder bis zu 3 seitliche Rhizoide durch Querwandbildung abgliedern, sterben nur zu dem gleichen Prozentsatz wie die Scheitelzellen. Unterschiede zwischen den Häufigkeiten toter Scheitelzellen auf der einen Seite und toter Endzellen und Rhizoiden auf der anderen sind nicht gesichert ($P = 0{,}60—0{,}50$).

Darüber hinaus besteht eine Beziehung zwischen dem Zeitpunkt des Todes einer Zelle und ihrer Stellung im Fragment (Abb. 1). Ein Vergleich der nach Positionen aufgeteilten Verteilungen der Todeshäufigkeiten nach 5 und 10 Tagen ergibt nach Anwendung der Kontinuitätskorrektur von YATES eine gesicherte Heterogenität der beiden

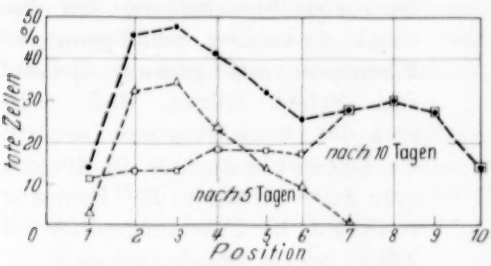


Abb. 1. Relative Sterbehäufigkeit der Zellen verschiedener Position. Dicke Linie: vom 1.—10. Versuchstag; dünne Linien: vom 1.—5. bzw. 6.—10. Tag

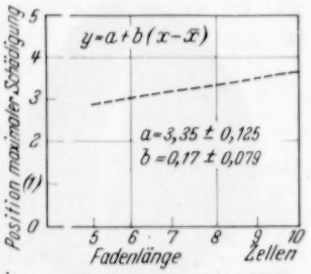


Abb. 2. Die Abhängigkeit der Position maximaler Schädigung (y) von der Fadenlänge (x), dargestellt als lineare Regression

Kontingentverteilungen ($\chi^2 = 48{,}871$; $P < 0{,}001$). Im einzelnen beruht diese Heterogenität auf signifikanten Unterschieden zwischen den Sterbehäufigkeiten nach 5 und 10 Tagen in den Positionen 2 und 3, in denen mehr Zellen im ersten Zeitabschnitt gestorben sind, und in den Positionen 7, 8 und 9, in welchen die Mehrzahl der Zellen erst nach 5 Tagen geschädigt waren. In allen genannten Stellungen sind die Häufigkeitsunterschiede toter Zellen zwischen der ersten und zweiten Zeitperiode bei $P = 0{,}01—0{,}001$ signifikant. Unterhalb von Verzweigungen tritt der Tod bei der Mehrzahl der Zellen ebenfalls erst nach 5 Tagen ein ($P = 0{,}05—0{,}02$).

Weiter war die Frage von Interesse, ob die Länge eines Filamentes, d. h. in diesem Zusammenhange die Zahl der Zellen bis zur Verzweigung, einen Einfluß auf die Resistenz der einzelnen Zellen in einer bestimmten Position hat. Entsprechende Berechnungen wurden für die Positionen 2—5 durchgeführt. Eine Regression der Position maximaler Schädigung auf die unterschiedliche Zellzahl eines Fragmentes oberhalb der Trägerzelle eines Seitenfilamentes ist signifikant ($b = 0{,}17$; $P = 0{,}04—0{,}03$). In der Abb. 2 ist die errechnete Regressionslinie dargestellt und mit den einfachen Standardabweichungen ihrer Konstanten bezeichnet. Sie zeigt, daß die am stärksten geschädigten Zellen längerer Filamente eine höhere Positionsnummer haben als diejenigen kürzerer Fragmente.

Bei der hier behandelten *Griffithia setacea* teilen sich nur die Scheitelzellen. Daher befinden sich die unter ihnen gelegenen und durch steigende Positionsnummern gekennzeichneten Zellen in immer älteren Entwicklungsstadien. Weil nach unveröffentlichten Untersuchungen die Teilungsrate der Scheitelzellen für die Zahl der Zellen oberhalb der Trägerzelle einer Verzweigung verantwortlich ist, liegen die Entwicklungsstadien der Zellen in den Positionen 2 und 3 bei längeren Fäden dementsprechend näher beieinander als bei kürzeren. Deshalb müssen die Ergebnisse über eine Verzögerung des Schädigungseintrittes bei den älteren Zellen und die Befunde über eine Verschiebung der Position maximaler Schädigung bei Filamenten mit größerer Zellzahl zum Schluß führen, daß nicht etwa der Ort im Fragment, sondern die Entwicklungsphase, in der sich eine Zelle befindet, die Resistenz bestimmt. Die Streckungsphase der Zellen ist am empfindlichsten.

Abb. 3. Isolierte Scheitelzelle vor dem Auskeimen

Da die Zellen in den Positionen 2 und 3 am leichtesten absterben, werden die Scheitelzellen häufig mechanisch vom Filament abgetrennt (Abb. 3). Diese Initialzellen keimen nach einer Ruhepause neu aus. In gleicher Weise reagieren isolierte Rhizoidzellen, die an ihrem äußeren Ende eine neue Scheitelzelle anlegen. Nach der Definition WILLES (1887) sind sie also als Akineten anzusprechen. Dabei darf aber nicht an eine bestimmte morphologische Ausbildung der Zellen gedacht werden. Der Terminus „Akinet" ist vielmehr funktionell zu verstehen. So stellen in diesem Sinne Akineten Zellen dar, die isoliert dank einer erhöhten Resistenz der vegetativen Vermehrung dienen können. Diese Widerstandsfähigkeit ist hier als eine Eigenschaft bestimmter Phasen im Leben der Einzelzelle beschrieben. Den im Filament tiefergelegenen Zellen müssen ebenfalls akinetenähnliche Eigenschaften zugesprochen werden; sie sind gegenüber den übrigen Zellen resistenter und stellen darüber hinaus die prospektiven Trägerzellen von Verzweigungen dar.

Als zweite Form der vegetativen Vermehrung stehen bei den Algen den Akineten die Zoosporen und deren Reduktionsformen, die Aplanosporen (LÜCK 1957) zur Seite. Bei ihnen tritt eine Erneuerung der Membran hinzu, die von WILLE im Sinne einer „Zellverjüngung" interpretiert wurde. Ob es sich wirklich im Gegensatz zu den Akineten um eine Verjüngung handelt, sei dahingestellt. In einer späteren

Veröffentlichung wird gezeigt werden, daß die Entwicklungsstadien, in denen Zellen sich zu Akineten, Zoo- und Aplanosporen umbilden, die gleichen sind.

Résumé

Les cellules apicales et les rhizoïdes de *Griffithia setacea* C. Ag. (= *Gr. flosculosa* Batt.) résistent trois fois mieux que les autres cellules à des conditions de culture défavorables. Les cellules âgées meurent moins vite que les jeunes. C'est la phase d'accroissement des cellules qui est la plus sensible. Les cellules apicales et les rhizoïdes peuvent fonctionner comme akinètes. Par akinètes on entend des cellules qui se trouvent dans certains stades définis de leur cycle de vie, caractérisés par une résistance élevée. Cette résistance leur permet, après isolement, de servir par germination à la reproduction végétative.

Literatur

Lück, H. B.: Au sujet d'un cas de formation d'aplanospores dans le genre *Cladophora*. Bull. Océanogr., Monaco, No 1105 (1957).

Wille, N.: Über Akineten und Aplanosporen. Jb. wiss. Bot. **18**, 492—514 (1887).

Dr. Hermann B. Lück;
Institut Botanique de l'Université, 5, Rue Broussonnet, Montpellier/Hérault, Frankreich

Planta 55, 112—114 (1960)

Kurze Mitteilung

Aus dem Institut für Obstbau der Universität Bonn
(Direktor: Prof. Dr. F. Hilkenbäumer)

INDOL-3-ESSIGSÄURE IM APFEL

Von
Gisela von Bargen

(Eingegangen am 30. März 1960)

Die Indol-3-Essigsäure (IES) ist, wie man annimmt, als Wuchsstoff im Pflanzenreich allgemein verbreitet, konnte aber in verschiedenen pflanzlichen Geweben, wie auch in denen des Apfels, bisher nicht nachgewiesen werden (Bentley[1]). Hancock und Barlow[3], die nach chromatographischer Auftrennung von Apfel-Blattextrakten mehrere saure Wuchsstoffe fanden, vermuteten zwar in einem davon IES. Die langjährigen Untersuchungen von Luckwill[9, 10] an Apfelsamen, -blättern und -früchten führten indessen zur Feststellung von 3 sauren Wuchsstoffen, Malus 1, 2 und 3 (vgl. Linskens[7]), von denen keiner mit IES identisch ist.

Mit dem Ziel, zu einer genaueren Identifizierung und somit zu besseren Kenntnissen über ihre Wirkungsweise zu gelangen, wurden die Apfelwuchsstoffe erneut untersucht, und zwar zunächst die aus dem frischen Pflanzenmaterial extrahierbaren sog. freien Wuchsstoffe. Unter diesen mußte sich die IES befinden, wenn sie überhaupt vorhanden war. Für ihren Nachweis waren folgende Schwierigkeiten zu berücksichtigen: Das Vorhandensein von IES kann nach Angaben von Booth[2] auch durch Zucker vorgetäuscht werden. Außerdem schwankt der R_f-Wert der IES bei der Chromatographie je nach Lösungsmittel ganz beträchtlich (Klämbt[5]); nach eigenen Erfahrungen können sowohl Hemmungen (in Wasser bis zu 50%) als auch Förderungen auftreten, und zwar letztere häufig in Isopropanol-NH_3-Wasser bei gerbstoffhaltigen Extrakten. Wenn der chromatographierte Extrakt Pigmente und Lipoide enthält, ist auch der Farbnachweis für Indole erschwert (Stowe, Thimann u. Kefford[11]). Bei den vorliegenden Untersuchungen hat sich folgende Methode bewährt: Die Apfelgewebe (Knospen, Fruchtfleisch) wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren, in gefrorenem Zustand zerkleinert und dann 24 Std lang bei 4° C mit Äther extrahiert. Von dem so gewonnenen Rohextrakt wurde durch Ausschütteln mit 8%iger Na-Bicarbonatlösung die saure Fraktion abgetrennt und mit Hilfe des basischen Ionenaustauschers Amberlite IR4B von unerwünschten Begleitstoffen (Gerb-

stoffe, Zucker, s. oben) gereinigt. Anschließend erfolgte die Chromatographie aufsteigend entweder eindimensional in Isopropanol-NH_3-Wasser oder zweidimensional (1. Wasser, 2. Isopropanol-NH_3-Wasser). Zur Prüfung der Wuchsstoff- bzw. Hemmstoffwirkung der einzelnen Chromatogrammabschnitte dienten der Weizen-Koleoptil-Test (Technik nach KLÄMBT[4]) und der Coleus-Blattfall-Test (Technik nach LUCKWILL[8]), zum Farbnachweis der Indole auf dem Chromatogramm p-Dimethylaminobenzaldehyd (Ehrlichs Reagens) und Eisenchlorid-Perchlorsäure. Als Kontrolle zu den normalen Extrakten wurden solche mit einem Zusatz von IES aufbereitet, und zwar sowohl für den Farbnachweis auf dem Chromatogramm als auch für den biologischen Test.

Im Verlauf dieser Untersuchungen ließ sich neben anderen Indol-Wuchsstoffen, über die noch gesondert berichtet werden soll, in treibenden vegetativen Knospen von Apfeltrieben und im Fruchtfleisch reifer Früchte eindeutig IES nachweisen. Die normalen Extrakte und die mit IES-Zusatz zeigten jeweils nur quantitative Unterschiede. Sie stimmten in der Position der IES auf dem Chromatogramm sowie in folgenden 3 Punkten überein: Farbreaktion mit verschiedenen Indolreagentien, Förderung des Streckungswachstums im Weizen-Test und Verzögerung des Blattfalls im Coleus-Test. Während der Gewinnung eines Extraktes (Ausschütteln in Äther usw.) wurde häufig ein Teil der zugesetzten IES zu 2-HO-IES (KLÄMBT[6]) umgesetzt, die durch ihre intensiv grünblaue Anfärbung mit Ehrlichs Reagens gut erkennbar ist. Dieselbe Verbindung trat gelegentlich auch in normalen Extrakten auf, worin ein weiterer Beweis für das Vorhandensein der IES in Apfelgeweben zu sehen ist.

Nach dem heutigen Stand der Kenntnisse über die Wirkungsweise der IES und auf Grund der Erfahrungen bei der Anwendung synthetischer Wuchsstoffe kann man vermuten, daß die IES (bzw. eine Verbindung, aus der IES freigesetzt werden kann) in vegetativen und reproduktiven Organen des Apfels an der Regulierung von Wachstumsvorgängen beteiligt ist.

Diese Untersuchungen wurden mit Mitteln des Bundesministeriums für Ernährung, Landwirtschaft und Forsten durchgeführt.

Literatur

[1] BENTLEY, J. A.: The naturally occuring auxins and inhibitors. Ann. Rev. Plant Physiol. **9**, 47—80 (1958). — [2] BOOTH, A.: Non-hormonal growth promotion shown by aqueous extracts. J. exp. Bot. **9**, 306—310 (1958). — [3] HANCOCK, C. R., and H. W. B. BARLOW: The assay of growth substances by a modified straight growth method. Ann. Rept. East Malling Res. Sta. 1952, S. 88—94 (1953). — [4] KLÄMBT, H. D.: Untersuchungen über Entwicklung und Wuchsstoffhaushalt bei Ribes-Arten. Planta (Berl.) **50**, 526—556 (1958). — [5] KLÄMBT, H. D.: Die Chromatographie der Indolyl-3-essigsäure. Ber. dtsch. bot. Ges. **72**, 185—187 (1959). — [6] KLÄMBT, H. D.: Die 2-Hydroxy-Indol-3-essigsäure, ein pflanzliches Indolderivat.

Naturwissenschaften **46**, 649—650 (1959). — [7] LINSKENS, H. F.: Papierchromatographie in der Botanik, S. 267. Berlin-Göttingen-Heidelberg: Springer 1959. — [8] LUCKWILL, L. C.: Two methods for the bioassay of auxins in the presence of growth inhibitors. J. horticult. Sci. **31**, 89—98 (1956). — [9] LUCKWILL, L. C.: Studies of fruit development in relation to plant hormones IV: Acidic auxins and growth inhibitors in leaves and fruits of the apple. J. horticult. Sci. **32**, 18—33 (1957). — [10] LUCKWILL, L. C., and L. E. POWELL: The absence of indoleacetic acid in the apple. Science **123**, 225—226 (1956). — [11] STOWE, B. B., K. V. THIMANN and N. P. KEFFORD: Further studies of some plant indoles and auxins by paper chromatography. Plant Physiol. **31**, 162—165 (1956).

Dr. GISELA v. BARGEN,
Institut für Obstbau der Universität Bonn a. Rh., Auf dem Hügel 6

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach Jansen" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse (höchstens 1 Seite) anzufügen, die in Deutsch oder Englisch oder Französisch abgefaßt sein kann.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und experimentellen Therapie

Herausgegeben von W. Kikuth, Düsseldorf, K. F. Meyer, San Francisco, E. G. Nauck, Hamburg, A. M. Pappenheimer jr., Cambridge/Mass., J. Tomcsik, Basel

33. Band:

Mit 69 Abbildungen. III, 443 Seiten Gr.-8°. 1960. DM 98,—

INHALTSVERZEICHNIS

Les corynébacterioses anaérobies. Par A.-R. Prévot, Paris/France · Die experimentelle Poliomyelitis und ihre Bedeutung für das Studium der Pathogenese. Von J. D. Verlinde, Leiden/Holland · Die L-Phase der Bakterien. Von O. Kandler und G. Kandler, Weihenstephan/Oberbayern · Die Resistenzbildung bei Mikroorganismen. Von G. Gillissen und I.-M. Gillissen, Mainz · The use of fluorescent antibody in the diagnosis and study of viral and rickettsial infections. By Chien Liu, Kansas City, Kansas/USA · Die Zellstruktur und die Serologie der Leptospiren. Von B. Babudieri, Rom/Italien · Haemophilus influenzae and its pathogenicity. By K. Zinnemann, Leeds/Great Britain · Neuere Aspekte der Virus-Interferenz. Von J. Lindenmann, Zürich · Namen- und Sachverzeichnis.

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Vor kurzem erschien:

Vierter Internationaler Kongreß für Elektronenmikroskopie

Fourth International Conference on Electron Microscopy

Quatrième Congrès International de Microscopie Électronique

Unter den Auspizien der International Federation of Electron Microscope Societies
Veranstaltet durch die Deutsche Gesellschaft für Elektronenmikroskopie, Berlin
10.—17. September 1958

Verhandlungen Band II:

Biologisch-medizinischer Teil

Herausgegeben von Professor Dr. WOLFGANG BARGMANN, Kiel,
Dr. DIETRICH PETERS, Hamburg, und Dr. CARLHEINRICH WOLPERS, Lübeck

Mit 650 Abbildungen. XV, 639 Seiten 4°. 1960. (91 Vorträge in englischer, 18 Vorträge in französischer und 57 in deutscher Sprache) Ganzleinen DM 196,—

INHALTSÜBERSICHT

Festvortrag: Electron microscopy in morphology and molecular biology. By F. O. SCHMITT · Elektronenmikroskopische Präparationstechnik in der Biologie: Fixieren und Einbetten. Schneiden und Mikrotome · Histochemie und Biochemie · Ordnungsprinzipien in der Biologie · Membranen und Membranmodelle · Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Zellmorphologie: Zellkern, Chromosom und Centriol. Cytoplasma und Zellorganellen · Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Anatomie: Epithelgewebe. Muskelgewebe. Kollagen. Hartgewebe. Exokrine Drüsen. Endokrine Drüsen. Exkretionsorgane. Respirationsorgane. Reproduktionsorgane. Nervengewebe. Sinnesorgane · Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Pathologie: Tumorgewebe. Strahlenwirkungen · Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Botanik · Ergebnisse der Elektronenmikroskopie in der Mikrobiologie: Protozoologie. Bakteriologie. Virologie.

Verhandlungen Band I: **Physikalisch-technischer Teil**

Herausgegeben von Professor Dr. GOTTFRIED MÖLLENSTEDT, Tübingen,
Dr. HEINZ NIEHRS und Professor Dr. ERNST RUSKA, Berlin

Mit 1026 Abbildungen. XIX, 851 Seiten 4°. 1960. (109 Vorträge in englischer, 23 Vorträge in französischer und 99 in deutscher Sprache) Ganzleinen DM 228,—

SPRINGER-VERLAG · BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Springer-Verlag, Berlin · Göttingen · Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany